

Série A, N° 1211

N° d'Ordre

2079

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

R. SARTORY

Chef des Travaux de Bactériologie et de Parasitologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DE LA CELLULOSE CHEZ
QUELQUES INSECTES XYLOPHAGES SOUS L'INFLUENCE
DE MICROORGANISMES

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 11 Novembre 1929 devant la Commission d'Examen

MM. MOLLIARD,	<i>Président</i>
PORTIER	{ <i>Examineurs</i>
DEREIMS	

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG

1929

Série A, N° 1211

N° d'Ordre
2079

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

R. SARTORY

Chef des Travaux de Bactériologie et de Parasitologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DE LA CELLULOSE CHEZ
QUELQUES INSECTES XYLOPHAGES SOUS L'INFLUENCE
DE MICROORGANISMES

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 7⁸ Novembre 1929 devant la Commission d'Examen

MM. MOLLIARD,	<i>Président</i>
PORTIER	} <i>Examineurs</i>
DEREIMS	

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1929



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyens C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.
Doyens honoraires.... P. APPELL, M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires. { A. JOANNIS.
H. LE CHATELIER.
H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
A. LEDUC.
R. DONGIER.
E. HÉROUARD.

Emile PICARD Analyse supérieure et algèbre supérieure.
G. KOENIGS Mécanique physique et expérimentale.
E. GOURSAT Calcul différentiel et calcul intégral.
P. JANET Electrotechnique générale.
F. WALLERANT ... Minéralogie.
H. ANDOVER Astronomie.
P. PAINLEVÉ Mécanique analytique et mécanique céleste.
Gabriel BERTRAND . Chimie biologique.
Mme P. CURIE Physique générale et radioactivité.
M. CAULLERY Zoologie (Évolution des êtres organisés).
G. URBAIN Chimie générale.
Emile BOREL Calcul des probabilités et Physique mathém.
L. MARCHIS Aviation.
Jean PERRIN Chimie physique.
Rémy PERRIER Zoologie (Enseignement P. C. N.).
H. ABRAHAM Physique.
M. MOLLIARD Physiologie végétale.
E. CARTAN Géométrie supérieure.
L. LAPICQUE Physiologie générale.
E. VESSIOT Théorie des fonctions et théorie des transformations.

Professeurs..... A. COTTON Physique générale.
J. DRACH Application de l'analyse à la géométrie.
Charles FABRY Physique.
Charles PÉREZ Zoologie.
Léon BERTRAND .. Géologie structurale et géologie appliquée.
R. LESPIEAU Théories chimiques.
E. RABAUD Biologie expérimentale.
P. PORTIER Physiologie comparée.
E. BLAISE Chimie organique.
P.-A. DANGEARD .. Botanique.
Paul MONTEL Mécanique rationnelle.
P. WINTREBERT ... Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSCQ Biologie maritime.
G. JULIA Mathématiques générales.
A. MAILHE Étude des combustibles.
L. LUTAUD Géographie physique et géologie dynamique.
Eugène BLOCH Physique théorique et physique céleste.
Henri VILLAT Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB Géologie
P. PASCAL Chimie minérale.
Léon BRILLOUIN .. Théories physiques.
V. AUGER Chimie appliquée.

E. PÉCHARD Chimie (Enseig. P. C. N.).
M. GUICHARD Chimie minérale.
A. GUILLET Physique.
C. MAUGUIN Minéralogie.
L. BLARINGHEM .. Botanique.
A. MICHEL-LÉVY . Pétrographie.
A. DEREIMS Géologie.
A. DENJOY Calcul différentiel et intégral.
H. BÉNARD Physique (P. C. N.).
E. DARMOIS Physique.
G. BRUHAT Physique.

H. MOUTON Chimie physique.
L. JOLEAUD Paléontologie.
M. JAVILLIER Chimie biologique.
A. DUFOUR Physique (P. C. N.).
F. PICARD Zoologie (Evolution des êtres organisés).
ROBERT-LÉVY Zoologie.
L. DUNOYER Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND . Botanique (P. C. N.).
A. DEBIERNE Radioactivité.
M. FRÉCHET Calcul des Probabilités et Physique mathématique.

Secrétaire : A. PACAUD, Chimie analytique.

A Monsieur M. MOLLIARD

Membre de l'Institut,
Doyen Honoraire de la Faculté des Sciences de Paris,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur.

A Monsieur P. PORTIER

Professeur à l'Institut Océanographique et à la Faculté des Sciences de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A Monsieur A. DEREIMS

Chargé de Cours à la Faculté des Sciences de Paris.

Témoignage de respectueuse reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Monsieur F. JADIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

A tous mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie
et de la Faculté des Sciences de Strasbourg

Hommage de ma profonde gratitude

INTRODUCTION

La valeur nutritive de la cellulose constitue une question d'un puissant intérêt et qui a déjà été étudiée par de nombreux chercheurs ; s'il a pu être utile au cours de la guerre d'aborder ce problème dans certains pays, à un moment où les denrées alimentaires étaient particulièrement rares et où l'on a tenté d'introduire dans la nourriture journalière de l'homme des aliments de remplacement, il n'en est pas moins intéressant d'examiner la question sous un autre angle.

Certains animaux et particulièrement certains insectes vivent exclusivement dans le bois pendant un temps plus ou moins long de leur évolution ; ils n'ont, à leur disposition, durant cette période, pour se nourrir que du bois, matière riche entre toutes en cellulose.

Nous nous sommes demandé si les microorganismes vivant dans la lumière du tube digestif de ces animaux possédaient une action dégradatrice sur la cellulose, facilitant ainsi la digestion et l'assimilation du produit par l'insecte.

Pour cela nous avons fait appel aux insectes suivants : *Cossus cossus* Linné, *Sciapteron tabaniformis* Rott. et *Cerambyx scopolii* Füssl. Pour chacun de ces insectes nous avons opéré sur trois souches : la première récoltée en Alsace dans les environs de Strasbourg, la deuxième en Allemagne (banlieue de Berlin), la troisième dans la région lyonnaise. Nos recherches nous ayant permis d'isoler chez les individus des diverses souches chaque fois les mêmes organismes, nous pouvions admettre une sorte de spécificité par rapport aux insectes envisagés.

Notre travail est divisé en deux parties :

Dans la première nous étudions l'histoire de la question : le premier chapitre est consacré aux recherches sur les ferments dégradant la cellulose dans le tube digestif des animaux.

Nous envisageons ensuite (chapitre II) la dégradation de la cellulose par les microorganismes suivant divers processus : par les bactéries dans le sol et les fumiers, chez les animaux, chez les végétaux, enfin par les champignons inférieurs dans la nature.

Dans la seconde partie nous décrivons nos recherches personnelles :

La chapitre I comprend l'exposé de nos méthodes et de notre technique générale.

Le chapitre II traite des milieux de culture employés au cours de nos essais.

Dans les chapitres III, IV, V et VI nous étudions les divers micro-organismes que nous avons isolé du tube digestif de nos insectes.

Nous exposons dans le dernier chapitre quelques considérations sur la transformation de la cellulose chez certains insectes xylophages.

Ce travail a été exécuté dans le Laboratoire de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, sous la direction de notre cher frère et Maître, le Professeur A. SARTORY.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur MOLLIARD, directeur du Laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté des Sciences de Paris, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse. Nous avons toujours trouvé auprès de lui l'accueil le plus bienveillant et il nous a toujours prodigué les conseils les plus éclairés.

Nous remercions bien vivement Monsieur le Professeur PORTIER dont la part est grande dans l'inspiration de cette thèse et Monsieur DEREIMS, chargé de Cours à la Faculté, qui ont accepté avec empressement de faire partie de notre Jury.

Toute notre reconnaissance va aussi à Monsieur SCHERDLIN, conservateur du Musée Zoologique de Strasbourg, à Monsieur GRAFF, bibliothécaire et enfin à nos chers amis et collaborateurs : J. MEYER, assistant à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, dont nous avons mis largement à contribution la gentillesse et le savoir, A. COMMERGNAT qui nous a prêté son concours et prodigué son soutien moral pendant l'élaboration de ce travail.

En terminant, nous nous en voudrions d'oublier que notre première éducation scientifique a été formée à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg; que Notre cher et vénéré Doyen, Monsieur le Professeur F. JADIN et que tous nos anciens Maîtres en cette maison reçoivent ici l'expression de notre gratitude respectueuse et bien sincère.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

Chapitre I : Recherches sur les ferments dégradant la cellulose dans le tube digestif des animaux.....

Chapitre II : La dégradation de la cellulose par les micro-organismes :

1^o La dégradation bactérienne de la cellulose dans le sol et le fumier..

2^o La dégradation de la cellulose par des bactéries chez l'homme et les animaux

3^o La dégradation bactérienne de la cellulose chez les végétaux

4^o La dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature

Chapitre III : Généralités sur la cellulose : constitution, réactions, hydrolyse chimique

CHAPITRE PREMIER

Recherches sur les ferments dégradant la cellulose dans le tube digestif des animaux.

CHAPITRE PREMIER

Recherches sur les ferments dégradant la cellulose dans le tube digestif des animaux.

Dans cet exposé nous considérerons deux cas : dans l'un nous envisagerons la digestion cellulosique opérée par des ferments pouvant exister dans les sucs digestifs des animaux supérieurs ou inférieurs ; dans l'autre nous examinerons la possibilité d'une attaque du polysaccharide par des ferments spéciaux existant dans les matières alimentaires mêmes, ingérées par ces êtres, action complètement indépendante de la composition des sucs digestifs.

La digestion de la cellulose par les sucs digestifs des animaux :

La digestion de la cellulose ayant été constatée particulièrement chez les herbivores, on a cru pendant longtemps que ces animaux l'assimilaient par un processus digestif et sous l'action de diastases présentes dans les sucs digestifs absolument comme pour le métabolisme des matières protéiques ou des Hydrates de Carbone simples. Mac GILLAVRY un des premiers (70) en préparant un extrait glyciné d'appendice de lapin et en le mettant en contact avec de la cellulose a déclaré que ce produit était digéré avec formation d'un sucre réducteur ; en contrôlant ces expériences DEGTIAREFF (22) a obtenu des résultats négatifs. Les auteurs qui suivirent avec SCHMULIEVITCH (98) attribuèrent à la pancréatine un rôle tout particulier dans la digestion de la cellulose, mais on ne sait si cet auteur a pris les précautions nécessaires en pareil cas : il ne dit pas s'il s'est servi d'antiseptiques. V. HOFMEISTER (48) opérant au moyen de sucs digestifs de différents animaux conclut que la salive mixte du mouton possède une action importante ; au contraire il reconnaît peu ou pas d'importance à la salive de la vache et à celle du cheval. Il exécute alors parallèlement deux séries de travaux : d'un côté il reconnaît l'action dissolvante des liquides obtenus par expression du contenu intestinal ; au contraire les essais

tentés par lui au moyen de macérations de pancréas et de muqueuse intestinale dans de l'eau phéniquée, par conséquent en présence d'antiseptique sont restés infructueux. SCHEUNERT (93) démontre dans des travaux plus récents que la salive du mouton n'a aucune action sur la cellulose. HOLDEFLEISS (50) prépare des extraits de muqueuses de la panse et du caecum du mouton et il les filtre sur un tamis de soie ; il les met en présence de cellulose et prolonge l'action pendant 6 jours : les résultats sont négatifs ; répétant ses expériences en employant cette fois uniquement le contenu de la panse et du caecum il n'obtient aucun résultat. Pensant que la filtration lente et leur contact avec l'air extérieur pouvait avoir une influence sur l'action des diastases, il recommence ses travaux en se servant alors d'un antiseptique : l'acide phénique et en abandonnant tout procédé de filtration. La cellulose mise en présence des extraits ainsi préparés se dissout dans la proportion d'environ 20 % et l'auteur constate un abondant dégagement de gaz carbonique et de méthane.

Dans les travaux qui suivirent on voit un souci constant des expérimentateurs, d'éviter les causes d'erreur ; ils ont recours à des procédés physiques (filtration) ou chimiques (addition d'antiseptiques) pour éviter l'action des germes microbiens : P. BERGMANN (11) prépara des extraits aqueux de muqueuse rectale et de l'intestin grêle de nombreux animaux tels que : poules, oies, cobayes, lapins, moutons, chevaux et différents bestiaux ; il opéra à une température de $+38^{\circ}$ pendant un temps qui variait entre 20 et 24 heures, en présence de toluène dans la proportion de 2 % comme antiseptique ; toutes ses expériences furent négatives.

SCHEUNERT (93) prélève le contenu caecal de porcs, chevaux et lapins ; il le filtre à trois reprises à travers des filtres de plus en plus fins ; il met en contact 1 gr. de cellulose de foin avec 50 cc. de liquide obtenu, à 38° pendant 65 heures. Le liquide résultant de la première filtration (à travers une toile) dissout 25,3 % de cellulose ; celui qui résulte de la filtration sur papier n'en dissout plus que 10,3 % ; enfin le dernier liquide passé à travers une bougie Berkefeld ne digère que 8,5 % de cellulose et encore perd-il ses propriétés si on le fait bouillir. Tous les essais de cet auteur pour obtenir une cellulase sont restés vains et la conclusion de ses travaux énonce que la digestion de la cellulose dans le tube digestif des animaux est produite uniquement par des bactéries ; qu'elle est d'autant plus profonde que le nombre de ces microorganismes dans le tube digestif est plus grand et que le séjour de ces aliments dans l'intestin est plus prolongé.

LOHRISCH (67) se sert d'extraits de muqueuses de l'intestin et d'extraits de pancréas de porc ; il ne parvient pas à une dissolution de

la cellulose quand il opère en présence de 2 % de toluène. C'est alors qu'il essaie de refaire les expériences de SCHEUNERT au moyen du liquide du caecum de cheval passé à travers une toile ; certaines de ces expériences lui donnent une quantité de 50 % de cellulose dissoute ; reprenant ses recherches en soumettant le liquide à l'ébullition, il n'obtient aucune attaque du polysaccharide. Cependant il ne conclut pas à une action bactérienne, car il remarque quelques faits troublants l'amenant à croire qu'il s'agit bien d'une action diastasique : les filtrats que l'on abandonne à la température du laboratoire perdent leurs propriétés dissolvantes assez vite ; si on les place à l'étuve leur activité se trouve diminuée considérablement ; au contraire la température de la glacière ne change pas leurs propriétés. LOHRISCH, en opérant en présence d'acide phénique a obtenu quelques résultats positifs.

ELLENBERGER (25) sur différents animaux a essayé de se rendre compte de l'action sur la cellulose, de la salive, des sucs gastriques, entériques, pancréatiques et biliaires. Ces expériences, en même temps que celles qu'il a tenté avec des extraits des différents organes sécrétant ces sucs ainsi que des organes lymphoïdes ne lui ont pas donné de résultats positifs. Ses conclusions sont en faveur d'une digestion exclusivement microbienne.

Chez les animaux inférieurs phytophages, les faits sont tout aussi confus ; nous rappellerons ici les recherches de KNAUTHE et ZUNTZ (59) qui préparèrent un extrait de l'hépatopancréas de la carpe ayant un pouvoir dissolvant sur la cellulose ; les expériences avaient été faites en présence de chloroforme et de thymol ; MULLER (79), en voulant reproduire ces expériences échoua. Les données sont assez nombreuses en ce qui concerne le suc de l'*Helix pomatia* (hépatopancréas) : BIEDERMANN et MORITZ (14), MULLER (79), LOHRISCH (67) et ALEXANDROWICZ prétendent que ce suc possède un pouvoir dissolvant vis-à-vis de la cellulose. PACAUT et VICIER (83) essaient de faire digérer la cellulose de la moelle de sureau au moyen de ce suc ; ils échouent. C'est alors que G. SEILLIÈRE (103) démontre que la cellulose de certains cotons naturels subit une dissolution par l'action du suc digestif de ce même *Helix*. Cet auteur arrive à opérer une digestion facile au moyen de celluloses traitées par le chlorure de zinc ou par des lessives alcalines à 25 % jusqu'à gonflement des fibres, de même pour la cellulose dissoute dans la liqueur de SCHWEITZER et reprécipitée ; la dessiccation diminue la digestibilité du polysaccharide. Le produit résultant de la digestion de la cellulose par le suc de l'*Helix pomatia* est du glucose.

Telles sont les données que nous possédons en ce qui concerne la digestion de la cellulose par les sucs digestifs.

Examinons maintenant l'action possible d'une diastase (cellulase) contenue dans les produits servant à l'alimentation.

La digestion de la cellulose par une diastase contenue dans les aliments :

En 1892 BROWN (16) émit l'opinion que l'embryon de l'orge contenait une diastase capable d'opérer la dissolution de la cellulose dans le tube digestif de certains animaux. Il nourrit des porcs à jeun depuis quelques jours au moyen de deux régimes différents : le premier reçoit de l'orge pulvérisée sans diastase ; le deuxième est nourri au moyen du même aliment auquel on ajoute 10 % d'orge germée séchée à l'air, très hydrolytique. On tue les deux animaux trois heures après les avoir alimenté et on procède à l'examen du contenu de l'estomac. Pour le premier porc les membranes cellulaires de l'orge alimentaire sont intactes ; en ce qui concerne le deuxième animal il en est tout autrement : les membranes de l'orge sont attaquées et le contenu cellulaire est désintégré. L'auteur conclut alors de cette expérience que seule l'enzyme existant dans l'embryon est capable d'une action dissolvante sur ces aliments cellulosiques et il considère que le rôle des bactéries est d'ordre négligeable vu la lenteur de leur action.

Les recherches de SCHEUNERT et GRIMMER (95) ont porté sur divers aliments que l'on donne ordinairement aux animaux : l'avoine, le maïs, la pomme de terre, le riz, les pois, l'orge, le seigle, le blé, le foin, la paille de seigle, les graines de lupin, etc. ... Ils abandonnent pendant 72 heures les aliments additionnés de solution de soude à 0,2 % à l'étuve à + 37°. Ils dosent ensuite la cellulose dans une prise d'essai ; ils pratiquent à la sortie de l'étuve un deuxième dosage et la différence doit leur donner la cellulose digérée ; dans aucune de leurs expériences ils n'ont pu prouver la disparition de cellulose ; ils concluent donc que dans les aliments, il n'y a pas de cellulase.

Toutes ces recherches n'ont pas réussi à prouver qu'il existait dans les aliments une diastase capable de dissoudre la cellulose ; on doit donc admettre la question résolue par la négative.

Tous les faits provenant des recherches sérieuses effectuées à la fois sur des sucs digestifs des divers animaux d'une part, et d'autre part sur les divers aliments servant à la nutrition des herbivores n'ont pas jusqu'ici prouvé l'existence de ferments capables de digérer le polysaccharide. Ainsi donc tout milite en faveur d'une digestion opérée par le concours de microorganismes qui pullulent dans le tube digestif des animaux phytophages.

CHAPITRE II

Dégradation de la cellulose par les microorganismes:

- 1^o La dégradation bactérienne de la cellulose dans le sol et le fumier.
 - 2^o La dégradation bactérienne de la cellulose chez l'homme et chez les animaux.
 - 3^o La dégradation bactérienne de la cellulose chez les végétaux.
 - 4^o La dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature.
-

CHAPITRE II

Dégradation de la cellulose par les microorganismes

Dans le chapitre précédent nous avons vu, qu'à part l'*Helix pomatia*, aucune recherche sur la mise en évidence de ferments digestifs d'animaux supérieurs ou inférieurs capables de dégrader la cellulose ne méritait d'être retenue.

Nous essaierons dans cette partie du travail de retracer les recherches ayant pour but de déterminer le rôle effectif de divers microorganismes dans la dégradation du polysaccharide.

Ce chapitre se divisera en quatre parties, étant donné les quatre domaines dans lesquels se sont cantonnées les études de cette fermentation ; tout d'abord nous envisagerons la dégradation de la cellulose dans le sol et le fumier.

1^o La dégradation bactérienne de la cellulose dans le sol et le fumier.

Les données les plus anciennes sur la dissolution de la cellulose par des microorganismes remontent à MITSCHERLICH (76) ; un peu plus tard POPOFF (84) continue dans la voie de MITSCHERLICH et réussit à obtenir une fermentation par le contact du polysaccharide avec des boues d'égout ; il met en évidence comme termes ultimes de l'anhydride carbonique et du méthane. Mais les travaux fondamentaux et qui ouvrent véritablement la voie dans cette orientation sont fournis par les publications de TAPPEINER (109) qui, le premier a nettement démontré que la décomposition cellulosique est d'origine bactérienne. Un peu plus tard DE BARY (7) attira l'attention sur la dissolution obtenue par les champignons. A partir du commencement du XX^e siècle, débute alors une série de travaux qui cherchent surtout à étudier les transformations profondes se passant dans le sol et dans le fumier et dans lesquelles la cellulose a sa place toute marquée. BERTHELOT (12) a démontré que, dans la décomposition du fumier, c'est surtout la cellulose qui est altérée. En même temps GAYON (34) prouva que la responsabilité du phénomène incombe à des microorganismes ; il réussit même à isoler une bactérie

rie anaérobie qui décompose la cellulose avec production d'anhydride carbonique et de méthane. Aujourd'hui on peut admettre que les recherches de GAYON se sont pratiquées non avec une espèce pure mais avec un complexe de microorganismes. DEHÉRAIN (23), en inoculant un milieu minéral avec du purin a aussi pu constater que la cellulose présente était décomposée avec formation de méthane et d'anhydride carbonique ; néanmoins les expériences de HOLDEFLEISS et SCHÖNFELDER (49) d'un côté, de MAYER (72) de l'autre ont démontré que dans la décomposition du fumier, ce sont surtout les pentosanes et seulement, en quantité minime, la cellulose qui subissent une transformation. HOPPE-SEYLER (52) trouve que la fermentation de la cellulose obtenue par des boues d'égouts repose sur l'activité du *Bacillus amylobacter* et il croit que la cellulose se transforme par cette fermentation en hydrates de carbone (sucres), substances qui, avec ou sans formation de produits intermédiaires, se décomposent en méthane et anhydride carbonique.

Grâce aux travaux de SCHLÖESSING père (97) sur les gaz formés au cours de la fermentation du fumier, BERTHELOT (12) est amené à conclure qu'il s'agit d'une décomposition cellulosique donnant de l'anhydride carbonique et du méthane. VAN SENUS (104) qui étudie la fermentation cellulosique et les produits intermédiaires de la dégradation ne peut caractériser aucun hexose, ni pentose ; il prononce déjà l'hypothèse suivant laquelle les bactéries hydrolysaient immédiatement les hydrates de carbone solubles produits au cours de leur action. Il réussit à isoler de l'intestin du lapin deux bactéries : le *Bacillus amylobacter* et un autre petit bâtonnet dont l'action simultanée est nécessaire pour l'attaque de la cellulose.

Les premières expériences sur l'action des bactéries thermophiles vis-à-vis du polysaccharide dans le sol ont été mises en œuvre par MAC FAYEN et BLAXALL (69) ; ces auteurs ensemençaient une solution minérale renfermant des petites quantités de bouillon au moyen de terre ; ils expérimentèrent à des températures allant jusqu'à 60° et ils observaient alors une décomposition de la cellulose accompagnée d'un dégagement gazeux très prononcé ; la destruction de la cellulose était un peu plus forte en anaérobie qu'en aérobie ; comme termes finals ils ont obtenu de l'anhydride carbonique et du méthane ; à 37° l'attaque de la cellulose et la fermentation n'étaient plus sensibles ; ces constatations ont bientôt été vérifiées et le phénomène étudié en tous détails par OMELIANSKY (82) qui isola du limon de la *Newa* des bactéries cellulophages anaérobies et thermophiles ; il pratiquait ses ensemencements sur un milieu électif donné par WINOGRADSKY et réussit à obtenir la transformation de la cellulose par deux bacilles qu'il isola : il appela le premier : Bacille de la fermentation hydrogénée et le deuxième Bacille de la ferment-

tation méthanique ; de ces deux organismes le dernier produit une décomposition de la cellulose à basse température, tandis que le premier est un thermophile ; l'auteur réussit à séparer l'action des deux bactéries par le procédé suivant : il introduisait dans un ballon des produits renfermant de la cellulose tels que papier, coton ou lin, etc. ..., de la craie et le milieu suivant : Phosphate d'ammonium : 0,1 ; phosphate dipotassique : 0,1 ; sulfate de magnésie : 0,05 ; et des traces de chlorure de sodium ; pour 100 cc. d'eau. Il remplissait le ballon complètement au moyen de cette solution et l'ensemait avec du crottin de cheval. On obtient alors généralement la fermentation méthanique de la cellulose. Si, par contre, il pratique les ensemencements en chauffant le milieu et le matériel pendant 15 minutes à $+75^{\circ}$, la fermentation méthanique est arrêtée et il obtient la production d'une fermentation hydrogénée de la cellulose ; la quantité de cellulose qui disparaît dans ce cas atteint 96 % : on voit donc qu'elle est considérable. Ces bactéries agissent seulement en anaérobie.

Un grand pas en avant dans l'étude de la dégradation de la cellulose dans le sol et le fumier est marqué par les travaux de VAN ITERSOM (54). Il écrit que des grandes quantités de cellulose provenant des feuilles mortes, des branches tombées, du papier, des toiles de lin, etc. ... se trouvent constamment mélangées avec la terre ; ces substances disparaissent, comme on le sait, très vite et presque complètement sans laisser de traces ; cette destruction de la cellulose dans le sol se fait d'après lui par quatre processus différents :

I. *Le processus en anaérobie* qu'il divise en deux parties :

a) en absence de nitrates de potasse par les bactéries de la fermentation méthanique et hydrogénée.

b) en présence des nitrates par les bactéries dénitrifiantes d'après la formule :



Cette réaction s'effectue toujours en l'absence de l'air ou dans une atmosphère pauvre en oxygène malgré que les bactéries qui en sont la cause sont elles-mêmes aérobies.

II. *Le processus en aérobie* que l'auteur divise aussi en deux parties :

a) si le milieu dans lequel la cellulose se trouve est alcalin, l'action dégradatrice revient à des bactéries principalement.

b) si le milieu est acide c'est à des champignons inférieurs ou à des myceliums de champignons supérieurs.

C'est surtout les trois derniers cas dans lesquels la décomposition de la cellulose s'est faite par des microbes aérobies que VAN ITERSON a examiné ; comme matière d'ensemencement, il a employé de la terre de jardin et des boues vaseuses, de l'humus et des feuilles sèches. Après trois à cinq jours il constate des taches jaunes brun sur le papier ou sur la cellulose ajoutée qui bientôt sont complètement décomposés ; il isole par ces procédés une bactérie cellulophage en forme de bâtonnet auquel il donne le nom de *Bacillus ferrugineus* ; en même temps il trouve aussi un microcoque. Sous l'action du bacille, la cellulose prend une consistance pâteuse et la fibre cellulosique s'entoure complètement d'un mucus. Pour faire la preuve que, dans la décomposition de la cellulose dans la nature, le bacille isolé joue un rôle spécifique, l'auteur enterre dans le jardin du Laboratoire de Botanique à une profondeur de 15 centimètres, de la toile de lin et des feuilles de papier-filtre ; cinq mois après, les feuilles de papier-filtre avaient complètement disparu dans la terre, tandis que la toile existait encore ; mais elle avait perdu toute sa cohésion et se désagrégeait en petits morceaux dès qu'on la touchait. VAN ITERSON réussit par sa méthode d'isolement à mettre en évidence, sur ces prélèvements, restes du matériel enterré, son *Bacillus ferrugineus*.

Les travaux sur les bactéries aérobies cellulophages ont été poursuivis par ROSSI, GRAZIA DE CAPRARIS (88) qui a pu isoler un *Bacillus comesii*, lequel décomposait la cellulose en présence de nitrates et un *Bacillus vulgatus* qui agissait sans nitrates. BEIJERINK et MINKMANN (10) ont obtenu, en employant aussi des boues vaseuses une décomposition cellulosique par des bactéries dénitrifiantes ; l'une est appelée *Bacillus nitrogenes* ; en poursuivant ses travaux BEIJERINK a démontré que le *Clostridium americanum* et l'*Azotobacter* sont incapables, en cultures pures, d'attaquer la cellulose ; il a trouvé en symbiose avec ces organismes un *Bacillus radiobacter* qui attaque fortement la cellulose en produisant de l'hydrogène comme terme final ; cette symbiose a occasionné, par la présence de la cellulose, un enrichissement en matières azotées du milieu. HEINZE (44) a pu prouver les mêmes faits en mettant l'*Azotobacter* en présence de bactéries cellulophages.

Nous arrivons à présent aux travaux d'une importance capitale de PRINGSHEIM (87) qui étudia les différentes formes de la dégradation de la cellulose du sol et du fumier : il classe ces phénomènes en quatre groupes :

1^o La fermentation méthanique de la cellulose avec les termes finals : méthane, anhydride carbonique et acides gras simples jusqu'à l'acide butyrique.

2° La fermentation hydrogénée de la cellulose avec les produits terminaux : hydrogène, anhydride carbonique, acides gras simples jusqu'à l'acide butyrique.

3° La fermentation cellulosique par des bactéries thermophiles aboutissant au méthane, à l'hydrogène, à l'anhydride carbonique à l'acide formique et à l'acide acétique.

4° La fermentation cellulosique par les bactéries dénitrifiantes dont les produits ultimes sont : l'anhydride carbonique et l'azote.

L'auteur en expérimentant ces différents processus d'hydrolyse a réussi à mettre en évidence les produits intermédiaires, c'est-à-dire des di- et monosaccharides résultant de l'action des endoferments produits par ces différentes catégories de bactéries.

Nous passerons à présent en revue les recherches de MÜTTERLEIN (81) qui nous a été d'un grand secours pour notre bibliographie. Cet auteur a démontré que la décomposition de la cellulose dans le sol, le fumier et dans la nature en général est surtout due à des organismes vivant en aérobie, malgré l'opinion généralement admise que ce sont des bactéries anaérobies qui assument la transformation pour la plus grande partie des produits cellulosiques ; il a prouvé que la température joue un rôle prépondérant dans le processus du phénomène et, de ses recherches, il ressort que la décomposition cellulosique à température élevée s'effectue non seulement par des bactéries anaérobies, mais encore et pour une forte proportion, par des organismes aérobies ; ces germes ont été isolés et caractérisés. D'un grand nombre d'expériences pratiquées au moyen de prélèvements très divers, l'auteur a seulement pu isoler une bactérie pour une vingtaine d'espèces cryptogamiques et nous nous verrons obligé de revenir dans un chapitre ultérieur sur ces travaux de haute valeur.

Mentionnons ici les recherches de KELLERMANN, MAC BETH, SCALES et SMITH (55) qui après une série d'expériences de longue haleine ont essayé de faire une classification des bactéries cellulophages du sol. Les auteurs donnent des descriptions détaillées des bactéries cellulophages suivantes : *Bacillus aurogenus*, *Bacillus aurogenus* var. *albus* ; *Bacillus biazoteus* ; *Bacillus caesius* ; *Bacillus rossicus* ; *Bacillus cellaseus* ; *Bacillus galbus* ; *Bacillus gelidus* ; *Bacillus cytaseus* ; *Bacillus pusilus* ; *Bacillus subalbus* ; *Bacterium acidulum* ; *Bacterium udum* ; *Pseudomonas effusa* ; *Pseudomonas per-lurida* ; *Pseudomonas tralucida*.

Ces organismes semblent plus actifs en anaérobie qu'en présence d'oxygène. Et les auteurs déclarent que ces bactéries sont largement distribuées dans le sol. Leur action principale sur les

hydrates de carbone s'effectue dans l'ordre de préférence suivant : Cellulose, Glucose, Maltose, Amidon, Saccharose, Lactose, Glycérine, Mannite.

En dernier lieu J. GROENEWEGE (40) a pu isoler des bactéries de la dénitrification cellulosique dont il a obtenu des cultures pures ; il a ainsi séparé trois sortes de bactéries : les premières occasionnaient la dénitrification d'un bouillon nitraté et n'attaquaient pas la cellulose, les secondes qui ne dénitrifiaient pas le bouillon nitraté, mais qui réduisaient en présence de cellulose les nitrates en nitrites, le troisième groupe n'a pas d'influence ni sur les nitrates, ni sur la cellulose. Dans le groupe I l'auteur a isolé le *Bacterium opalescens* et le *Bacterium viscosum*. Dans le groupe II il sépara le *Bacterium cellaresolvens* dont trois variétés : *Bact. cellar. α* ; *Bact. cellar. β* ; *Bact. cellar. γ* ; ces dernières bactéries attaquent certainement la cellulose et les produits de dégradation en résultant servent de nourriture au *Bacterium opalescens* et au *Bacterium viscosum*. Nous avons donc ici une symbiose véritable, qui est très importante dans le processus de la dégradation cellulosique en aérobie. Dans le chapitre IX de son travail, GROENEWEGE traite de la cellulase, enzyme hydrolysant la cellulose qui, jusqu'à présent n'était guère connue. Ces recherches prouvent l'existence de la cellulase qu'il qualifie d'enzyme attaquant la cellulose et diffusible dans les milieux extérieurs. Il admet que par la dégradation de la cellulose, il y a formation de sucres qui constituent les stades intermédiaires et il compare l'action de la cellulase sur la cellulose à l'action de l'amylase sur l'amidon.

Considérant le grand nombre des scientifiques qui ont traité cette question et devant des faits aussi décisifs, nous sommes en droit de conclure que la destruction et la disparition des produits cellulosiques dans le sol et dans le fumier est due à l'action de micro-organismes qui jusqu'à présent peuvent être répartis suivant leur affinité dans les quatre groupes créés par VAN ITERSOM c'est-à-dire : *Anaérobies* : 1^o agissant en présence de nitrates ; 2^o agissant en l'absence de nitrates ou bactéries dénitrifiantes. *Aérobies* : 3^o en solution alcaline : bactéries ; 4^o en solution acide : les champignons.

2^o La dégradation bactérienne de la cellulose chez l'homme et les animaux supérieurs.

Les herbivores tirent un très grand parti de leurs aliments hydrocarbonés quoique ceux-ci contiennent un pourcentage élevé en cellulose ; les omnivores, d'un autre côté, font aussi appel à la cellulose pour leurs besoins alimentaires et c'est uniquement les

carnivores purs comme le chien qui négligent cette alimentation. Dans un chapitre précédent nous avons énuméré les expériences qui ont été faites afin de rechercher dans les sucs digestifs des animaux ou dans les aliments mêmes un produit capable de démolir la molécule cellulosique afin de la transformer en produits assimilables par l'organisme. Il n'est pas étonnant, après les nombreux travaux qui ont nettement démontré le rôle important des micro-organismes dans la disparition de la cellulose du sol et du fumier, de voir, très tôt, un grand nombre de chercheurs essayant de prouver l'influence des infiniment petits en ce qui concerne la dégradation de la cellulose dans le tube digestif des animaux.

Ces recherches remontent à 1850 environ ; les premières tentatives d'explication de la disparition de la cellulose au cours de la digestion ont été faites sur des ruminants ; nous tenons à citer ici HAUBNER (42) qui expérimenta sur la vache, HENNEBERG et STOHMANN (46) sur le bœuf, HOFMEISTER (47) sur le mouton, KUHN, ARONSTEIN et SCHULZE (5) sur le bœuf, le même KUHN en collaboration avec FLEISCHER sur la vache, WEISKE (116) sur le porc et en collaboration avec SCHULZE et FLEISCHIG (31) sur le mouton et WILSING (118) sur la chèvre ; tous ces chercheurs ont employé, comme aliment cellulosique d'épreuve, le foin et la paille, et le coefficient de digestibilité de ces substances varie entre 50 et 65 %, rarement il est supérieur.

Un grand nombre d'expériences a été fait d'autre part sur le cheval par ELLENBERGER et HOFMEISTER (48) d'un côté, de MUNTZ et GIRARD (80) de l'autre ; ces auteurs ont pu constater que la dégradation de la cellulose s'effectue chez le cheval presque exclusivement dans la partie terminale de l'intestin ; leurs résultats montrent la grande différence existant dans l'assimilation, qui dépend de la nature des aliments cellulosiques : c'est ainsi que le coefficient de digestibilité de la cellulose de carotte est de 90,2 % tandis que pour le sarrasin ce chiffre tombe à 5,2. De plus récents travaux ont été entrepris par GRANDEAU et ALEKAN (37) avec les aliments habituels du cheval et ces auteurs trouvent alors pour le foin, l'avoine et le maïs des coefficients de 30 à 50 %. WAENTIG et GIERISCH (112) reprennent ces travaux tout récemment et ils emploient, pour mettre en évidence la digestibilité de particules cellulosiques des plantes, du bois de pin qu'ils mélangent à la nourriture. Ils ont ainsi une substance purement cellulosique (fibres brutes) et constatent une disparition au cours du séjour dans l'intestin de 10 à 20 %. VON KNIRIEM (60) a recherché la valeur alimentaire de la cellulose administrée sous la forme de différents produits, pour le lapin en vue du remplacement partiel de la matière azotée par des aliments ternaires. Tous ces travaux ont eu pour objet de déterminer la valeur

alimentaire de la cellulose, mais n'ont jamais eu pour but de rechercher l'isolement de bactéries susceptibles de dissoudre le polysaccharide.

C'est TAPPEINER (109) le premier qui réussit à prouver que les agents de la décomposition cellulosique dans la panse, le colon et le caecum du bœuf ainsi que dans le colon et le caecum du cheval sont des microorganismes ; la fermentation dans le tube digestif aboutit au méthane ou à l'hydrogène, comme elle procède dans le fumier ; chez le cheval et le porc, la fermentation hydrogénée s'installe d'abord et c'est seulement dans le gros intestin qu'elle cède la place à la fermentation méthanique. Chez les ruminants, cette dernière est prédominante. TAPPEINER a produit des recherches sur la cellulose, in vitro, en bouillons neutres ou alcalins. La réaction joue un rôle important : la neutralité favorise la fermentation méthanique et l'alcalinité favorise la fermentation hydrogénée. Par des cultures il a pu constater que cette fermentation est due à un bâtonnet à spore subterminale ou terminale qu'il n'a pas obtenu en cultures pures.

ANKERSCHMITT (2) isole du contenu intestinal des Bovidés des microbes qui, dans le milieu initial (contenu intestinal), font disparaître la cellulose. En cultures pures ces organismes n'ont jamais attaqué le polysaccharide.

HÖSSLIN et LESSER (53) mettent en évidence des microorganismes anaérobies dans le tube digestif du cheval qui, en cultures attaquent la cellulose ; ils ne réussissent pas à caractériser une enzyme et ils incriminent comme cause de la dissolution de la cellulose, les bactéries.

DISTASO (24) isole de l'intestin du poulet une bactérie grêle à spores subterminales ovalaires. Cette bactérie Gram négative cultive à $+37^{\circ}$ en anaérobie ; elle n'hydrolyse ni le lactose, ni le maltose pas plus que le saccharose et ne donne pas lieu à la production de gaz sur la gélose glucosée ; par contre elle transforme l'amidon en glucose. Son action sur le papier Berzelius, en milieu minéral, amincit progressivement le papier jusqu'à le dissocier et le transformer en flocons composés de fibres. Cependant, comme le fait remarquer l'auteur lui-même, cette digestion incomplète a été poursuivie sur une cellulose dont on ne connaît pas le degré de pureté ; aussi ne prouve-t-elle pas le pouvoir hydrolysant du bacille isolé par DISTASO et que celui-ci a appelé *Bacillus cellulosaes desagregans*.

CHOUKEVITCH (20), en dernier lieu, mettant en contact le contenu de l'intestin du cheval avec de la cellulose constata une dissolution de celle-ci ; il parvint à isoler un *Bacillus amylobacter* de l'intestin des Bovidésqui, a un pouvoir fermentatif vis-à-vis de l'amidon et de

la cellulose ; en même temps il décrit d'autres bactéries isolées de l'intestin du cheval, lesquelles sont sans aucune action sur le polysaccharide.

Telles sont les expériences, poursuivies par les différents auteurs, qui prouvent que la dégradation cellulosique dans le tube digestif des animaux supérieurs incombe uniquement à l'action hydrolysante exercée par les bactéries.

Pour clore ce chapitre il ne nous reste qu'à mentionner les recherches entreprises pour démontrer la désagrégation de la cellulose dans le tube digestif de l'homme par les Bactéries.

Nous savons, par les expériences mises en œuvre par WEISKE (116), VON KNIRIEM (60), WICKE (117), RUBNER (89), BARANY (6), HOFMEISTER (47), LOHRISCH (67), que la cellulose disparaît dans certaines proportions au cours de son passage dans le tube digestif de l'homme et en particulier on a pu prouver que le polysaccharide des légumes tendres tels que la carotte et le chou blanc sont presque intégralement assimilés. Longtemps les agents ou les causes de cette digestion sont restés inconnus et c'est à Madame KHOUVINE-DELAUNAY (57) que revient le mérite d'avoir pu isoler et obtenir en cultures pures une bactérie strictement anaérobie, le *Bacillus cellulosa dissolvens*, capable d'attaquer la cellulose. Cet organisme a été isolé dans 60 pour 100 des cas étudiés ; c'est un bâtonnet à spores terminales, très résistant à la chaleur et végétant seulement en milieu renfermant une source d'azote très dégradée ; l'action destructrice de cette bactérie sur la cellulose est très prononcée ; il désagrège 1 gramme de cette substance en 16 jours ; en association avec d'autres espèces microbiennes, et nous tenons à faire ressortir ici cette propriété, l'organisme désagrège pendant la même période 5 fois plus de matière cellulosique ; les produits de désagrégation en résultant ont été caractérisés par l'auteur comme étant du gaz carbonique, de l'hydrogène, de l'alcool éthylique, des acides acétique et butyrique et un pigment jaune. En outre madame KHOUVINE a pu déceler des traces d'acide lactique et de produits d'hydrolyse précipitables par l'alcool. Des saccharides solubles dans l'alcool sont supposés exister et l'auteur se propose de les déterminer ultérieurement.

3° La dégradation bactérienne de la cellulose chez les végétaux.

Pendant longtemps on niait la possibilité d'une bactériose végétale ; même après des travaux effectués avec toute rigueur et en employant une technique bactériologique moderne, on hésitait à se libérer du préjugé qui était appuyé sur des conceptions anciennes. MIGULA (74) fut le premier qui, dans sa systématique des bactéries,

admit un petit nombre de maladies bactériennes des végétaux, mais il réserve son opinion et il ne pense pas que les bactéries puissent envahir l'intérieur de la plante en décomposant la membrane. En 1900 nous assistons à un débat scientifique passionné entre SMITH et FISCHER (106); malgré les travaux méticuleux de SMITH au sujet des diverses maladies des plantes, FISCHER reste sur ses positions et il déclare qu'une maladie bactérienne chez les plantes constitue un non-sens. Il croit que les bactéries ne peuvent commencer leur action destructrice que lorsque la plante se trouve déjà lésée, soit par une action mécanique, soit par un écart de température. En 1878 BURRIL (17) isole pour la première fois une bactérie, le *Micrococcus amylovorus* qu'il incrimine dans la maladie du mildiou des poires; ces travaux ont été repris par Arthur WAITE; à la même époque PRILLIEUX (86) montre que le *Micrococcus tritici* est l'agent de la maladie du blé et il déclare que l'évolution de la maladie passe par les stades suivants : corrosion des amyloblastes, puis des protéïdes et finalement on assiste à une destruction de la cellulose. WAKKER (113) en expérimentant les causes d'une maladie des jacinthes (Gelbstreifenkrankheit) observe aussi une dissolution de la cellulose par les bactéries. Cette question fut ensuite étudiée avec plus de soin et fit un pas en avant par les travaux de POTTER (85) qui isole, comme agent de la pourriture blanche des betteraves, le *Pseudomonas destructans*, bactérie qui par sécrétion d'une enzyme, détruit d'abord les lamelles mitoyennes, puis ensuite toute la membrane de la cellule; par une surproduction d'acide oxalique le plasma est ensuite anéanti. LAURENT (65) a mis en évidence la digestion des particules cellulosiques des pommes de terre par une association du *Bacillus fluorescens pudilus* et du *Bacillus coli communis*; Van HALL (41) isole les toxines agissant sur les choux-fleurs, produites par le *Bacillus oleracea* et sur l'iris, par le *Bacillus omnivorus*; il démontre qu'il s'agit de la sécrétion d'une enzyme cellulolytique dont l'action débute sur les lames mitoyennes pour digérer ensuite toute la membrane cellullosique.

Nous trouvons ensuite des observations de MOLISCH (77) sur la destruction des membranes cellulosiques des dents foliaires de différents genres d'ELODEA que l'auteur met sur le compte de bactéries; MERKER (73) a pu élucider cette question en ensemençant le milieu d'OMELIANSKY avec des prélèvements obtenus par contact des feuilles malades avec des morceaux de papier-filtre introduits dans le milieu; il réussit ainsi à isoler deux microcoques dont il obtient le premier en culture complètement pure tandis que le deuxième présentait une pureté relative. Il les appelle *Micrococcus cytophagus* et *Micrococcus melanocyclus*; le premier attaque la cellulose très intensivement et décompose le papier-filtre en produisant des taches

jaunâtres vitreuses. L'auteur ajoute que la décomposition de la cellulose se fait par contact intime des germes avec les fibres à tel point que, après trois semaines, on pourrait parler d'une « pseudomorphose » bactérienne suivant la forme des fibres cellulosiques. Il réussit à transmettre par contact intime ou par piquûre, la maladie sur des espèces différentes et il obtient ainsi une dissolution des membranes cellulosiques par les bactéries sur des feuilles de *Mnium* et *Sphagnum*. Seules résistaient à l'attaque des bactéries cellulophages les parties subéreuses ou incrustées de silice.

Tout ces faits nous montrent le rôle important des bactéries cellulophages dans les maladies des plantes et ils sont une preuve de plus du pouvoir dégradateur et décomposant des microorganismes sur la cellulose soit en aérobie, soit en anaérobie.

4^o La dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature.

Dans le chapitre précédent nous avons essayé de donner un aperçu sur l'action des bactéries dans les maladies végétales occasionnées par l'attaque de la membrane cellulotique; il nous a été impossible de faire l'énumération complète des travaux relatifs à ce sujet; aussi nous permettons-nous de renvoyer au traité magistral de ERIKSON (27) qui décrit ces bactérioses en détail, en indiquant une bibliographie copieuse.

En ce qui concerne les champignons susceptibles de produire des mycoses végétales nous renvoyons à la même source.

La dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature est un phénomène d'un ordre encore beaucoup plus vaste que la dégradation bactérienne. Jusqu'à présent on a toujours admis que cette destruction due aux champignons se passait exclusivement en aérobie; dès le début de notre étude, nous avons aussitôt pensé qu'il était nécessaire d'examiner l'action de ces organismes à la fois dans des conditions aérobies et anaérobies. La nécessité de ces recherches nous a semblé inévitable vu les conditions dans lesquelles se déroule les processus digestif et assimilateur de la cellulose dans le tube digestif des larves et des insectes xylophages. Nous verrons donc dans la suite que, au cours de nos travaux, le champ de l'étude de l'action des champignons sur la cellulose a été encore agrandi.

Que les champignons aient la capacité de digérer la cellulose, c'est une idée que l'on n'oserait plus contester de nos jours : le fait est admis depuis longtemps car, dès le début de l'étude des cryptogames, on a constaté qu'une catégorie de ces êtres est capable de s'introduire à l'intérieur des cellules végétales. Ils sont donc contraints de traverser les membranes, qui pour la plus grande partie, sont composées de cellulose. Cette propriété revient aussi bien à

certains champignons saprophytes qu'à des champignons parasites. Nous trouvons des recherches précoces sur l'action lytique des champignons vis-à-vis de la cellulose dans les travaux de DE BARY (7). Cet auteur travailla avec *Peziza sclerotiarum* LIBERT et indiqua que cette espèce sécrète un poison qui a la propriété de tuer le protoplasme et de dissoudre les lames mitoyennes des membranes cellulaires et plus ou moins les membranes cellulodiques elles-mêmes; plus tard BEHRENS (8), en étudiant les parasites de la pourriture des poires et des pommes, effectua des recherches sur l'action destructrice de différents champignons sur la cellulose; ces parasites sont *Botrytis vulgaris*, *Penicillium luteum*, *Penicillium glaucum*, *Mucor stolonifer* et *Oidium fructigenum*.

L'auteur constate que seul *Botrytis vulgaris* attaque la cellulose; un chapitre très important traitant de l'action dissolvante des champignons sur la cellulose a été ébauché par APPEL (3) et ensuite étudié en détail par le même auteur et ses élèves, en ce qui concerne les *Fusarium* parasites des plantes. SCHIKORRA (96) rechercha le pouvoir dissolvant du *Fusarium vasinfectum* var. *pisi*. Dans ses cultures, il trouve après 10 jours une pousse très luxuriante sur milieu cellulodé et, après 50 jours, le papier-filtre employé était complètement transformé en une masse pâteuse. Afin de rechercher si le champignon produit une enzyme, l'auteur a trituré le mycelium adhérent au papier-filtre avec du sable fin, puis il a lavé le mélange sur un filtre au moyen d'eau distillée; dans ce filtrat il put mettre en évidence une enzyme attaquant la cellule vivante en la plaçant au contact de *Symphoricarpos racemosus* et d'*Allium cepa*. Il donne comme quantité de cellulose disparue au cours de sept semaines : 48, 25%, mais le dosage a été effectué par simple séparation mécanique. Vers la même époque SCHELLENBERG (92) effectua des recherches sur l'action de quelques champignons sur les polysaccharides; il trouve des champignons qui attaquent et décomposent facilement l'hemicellulose et ne peut jamais mettre en évidence par sa méthode une décomposition de la cellulose proprement dite. Dans sa technique, cet auteur employa des coupes microscopiques de plantes supérieures qu'il ensemait au moyen de champignons en les maintenant dans la chambre humide microscopique; ces constatations se limitaient alors uniquement à l'observation au microscope. Les travaux sur les *Fusarium* ont été ensuite poursuivis par SCHAFFNIT (91) sur *Fusarium nivale*; ses conclusions expriment que le *Fusarium nivale* attaque dans les membranes végétales les éléments cellulodiques et non les matières pectiques. Pendant la guerre ces études continuèrent et HELLER (45) examina le pouvoir cellulolytique de différentes espèces cryptogamiques, en employant des méthodes rigoureuses. Cet auteur expérimenta le *Fusarium lolii*, *Fusarium*

metachroum, *Fusarium theobromae*, *Fusarium cœruleum*, *Fusarium subulatum*, *Fusarium discolor*, *Fusarium Martii*, *Fusarium Willkommii*, *Fusarium orthoceras*, *Fusarium falcatum*, *Fusarium gibbosum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium lateritium*, *Trichothecium roseum*, *Mucor stolonifer*, *Mucor mucedo* et *Penicillium glaucum*. De ces recherches il ressort que tous les *Fusarium* expérimentés sauf le *Fusarium subulatum* ainsi que le *Rhizoctonia* et le *Trichothecium* possèdent un pouvoir cellulolytique très prononcé. Une attaque faible est réalisée par *Fusarium subulatum*, *Penicillium glaucum*; les *Mucor mucedo* et *stolonifer* sont restés sans action sur la cellulose. Tous ces organismes ont été sans aucun pouvoir sur l'hémicellulose.

Quant au *Fusarium lolii* et au *Fusarium nivale* HELLER a pu démontrer qu'ils sécrètent à part une cellulase, aussi une pectinase.

En dehors de ces études spécialisées sur les *Fusarium* nous trouvons des recherches traitant de l'action lytique vis-à-vis de la cellulose par d'autres espèces dans les travaux de VAN ITERSON (54) qui, par sa technique devenue classique depuis, démontra que trente-cinq moisissures détruisaient la cellulose. Il étudia quinze champignons inférieurs en détail, dont nous indiquerons ici les noms : *Trichocladium asperum* Harz, *Mycogene puccinoïdes* Sac., *Stemphylium macrosporoïdeum* Sac., *Chaetomella horrida* Oud., *Botrytis vulgaris* Fr., *Epicoccum purpurascens* Ehrenb., *Chaetomium kunzeanum* Zopf, *Stachybotrys alternans* Oud., *Cladosporium herbarum* Link., *Pyrenochaeta humicola* Oud., *Pyronema confluens* Müll., *Sordaria humicola* Oud., *Sporotrichum bombycinum* Rabh., *Sporotrichum roseolum* Oud. et Beijer., *Sporotrichum griseolum* Oud. VAN ITERSON a pu isoler une enzyme, la cellulase et suivant l'action de celle-ci, il classait les champignons isolés par lui en trois groupes : champignons destructeurs de la cellulose en quantité forte, moyenne et faible ; HAUMANN (43) indique comme cellulophages les champignons suivants : *Penicillium glaucum*, *Mucor Mucedo*, *Cladosporium herbarum*, *Sclerotinia Libertiana*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger* ; ces résultats semblent contradictoires avec ceux de BEHRENS pour *Penicillium glaucum* et ceux de VAN ITERSON pour *Mucor mucedo*. FRÖHLICH (33), en examinant des champignons très répandus sur les plantes mortes trouve que *Alternaria tenuis* Nees, *Macrosporium commune* Rbh. et *Hormodendron cladosporioides* Sac. sont capables de couvrir leurs besoins hydrocarbonés uniquement au moyen de cellulose. CARBONE et MARINCOLA-CATTANEO (71) examinent sept différents représentants d'*Eumycètes* isolés de la terre ; ces champignons dissolvent très vite les matières pectiques, quelques-uns aussi la cellulose. Les auteurs ne trouvent pas de produits intermédiaires de cette dégradation.

Une classe de champignons qui, de même, semble jouer un rôle très important dans la destruction cellulosique est celle des *Actinomycètes* ; dans cette voie, des travaux ont été poursuivis par FOUSEK (32), il examina *Streptothrix chromogena* et *Streptothrix alba* : ces champignons sont des agents destructeurs très actifs de la cellulose et ils occasionnent toujours la formation de pigments au cours de leur attaque. La plupart des organismes isolés dans les travaux remarquables de MÜTTERLEIN (81) semblent appartenir à ce groupe ; les conclusions de l'auteur sont les suivantes : à l'encontre de l'opinion généralement admise que ce sont les bactéries anaérobies qui viennent en question dans la disparition de la cellulose dans la nature, ses recherches prouvent que dans ce processus l'action prépondérante revient à des organismes aérobies et parmi eux surtout aux champignons et aux *Actinomycètes*.

Il nous reste à mentionner les recherches importantes et de longue haleine sur l'assimilation de la cellulose dans le tube digestif des animaux domestiques tels que mouton, bœuf, cheval et porc, exécutées par ELLENBERGER (25) et ses élèves SCHEUNERT (93) et HOPFFE (51). Dans ces travaux les auteurs ont décelé une quantité de bactéries cellulophages, mais à côté de ces bactéries, ELLENBERGER a trouvé constamment chez tous les animaux domestiques une moisissure appartenant à la famille des *Périsporiacées* et au genre *Aspergillus* ; ce champignon a été cultivé en toute pureté ; il présentait une grande affinité pour la cellulose ; des cultures ont été pratiquées en aérobie et en anaérobie ; les auteurs ont examiné l'activité cellulolytique de leur organisme et ils trouvent que, au bout de 15 jours, 8,75 % de cellulose mise à sa disposition ont disparu ; au bout de 50 jours ce chiffre monte à 52,56 % et même peut atteindre 60 %. Ils ont isolé une cellulase et ont pu mettre en évidence que la décomposition de la cellulose par ce champignon suit des voies toutes différentes de la fermentation cellulosique produite par les bactéries. Ils ont pu observer que cette fermentation bactérienne gazeuse est arrêtée ou très ralentie par la présence de leur *Aspergillus* en symbiose.

Nous n'avons pas l'ambition de vouloir, dans ce chapitre, relater toutes les expériences faites sur la question, mais nous croyons que par le nombre et la valeur des travaux cités, nous avons le droit de conclure que la dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature occupe une place très importante sinon primordiale. Dans ces recherches on a pu mettre en évidence la cellulase et caractériser les produits intermédiaires et finals de la dégradation qui, d'un côté, possède une action bienfaisante en ce qui concerne la digestion chez les animaux et l'amélioration du sol, d'un autre exerce son effet nocif sur les végétaux vivants.

CHAPITRE III.

Généralités sur la cellulose

constitution chimique.

réactions chimiques.

hydrolyse chimique.

CHAPITRE III

Généralités sur la cellulose — Définition — Constitution chimique — Réactions chimiques et hydrolyse chimique

Sous le terme cellulose on désigne aujourd'hui un produit appartenant au groupe des hydrates de carbone qui constitue la substance de soutien de la cellule végétale. La signification de ce mot a subi une évolution profonde au cours des années. On admettait pendant longtemps que les membranes cellulaires étaient uniquement formées de cellulose ; cette hypothèse a dû céder devant des faits expérimentaux qui ont démontré que la membrane végétale renfermait un complexe de substances ; c'est ainsi que HENNEBERG et STOHMANN modifient la définition précédente et désignent sous le terme cellulose, la partie digestible de la fibre brute (Rohfaser) (46) Mais bientôt des chimistes tels que TOLLENS (110) et KELLNER (56) firent remarquer que ces parties digestibles étaient aussi des substances composées et renfermaient surtout des pentosanes. Il serait préférable de dire les celluloses au lieu de la cellulose, car rien ne prouve que la cellulose soit une espèce unique. D'après CROSS et BEVAN (21) il existerait trois sortes de celluloses ; d'autre part HOFMEISTER (48) a déjà en 1881, démontré qu'il y avait une notable différence entre la cellulose issue de bois de bouleau et celle provenant du bois de pin ; plus tard KENIG (62) et ERNEST (28) ont démontré de même que la teneur en carbone des différentes celluloses variait beaucoup. Aujourd'hui nous désignons sous ce terme, dans le sens purement scientifique, la cellulose du coton ; des autres variétés de cellulose, par exemple celles obtenues à partir de bois, de lin, de chanvre ressemblent à la cellulose de coton, mais s'en éloignent quand même par différents caractères. Le coton hydrophile pur, le papier-filtre que l'on désigne généralement sous le terme de cellulose pure sont des celluloses plus ou moins modifiées par les traitements au moyen des alcalis, les acides et les autres réactifs employés pour le blanchiment. La préparation technique

de la cellulose se fait aujourd'hui le plus souvent à partir du coton ; d'autre part on emploie aussi diverses fibres végétales, tels que les chiffons de toile de lin. De très grandes quantités de cellulose sont préparées à partir du bois en le chauffant sous pression avec de la lessive de soude et des solutions de bisulfite de chaux. En continuant l'épuration on peut obtenir, du produit de commerce ainsi préparé, de la cellulose presque pure ; la paille aussi est employée comme source de cellulose.

En chimie on désigne sous le nom de cellulose la substance qui répond aux caractères d'identité et aux propriétés suivantes : cette substance bleuit au contact avec de l'iode, lorsqu'elle a été préalablement traitée par l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique concentrés, ou par le chlorure de zinc. La coloration bleue doit disparaître par addition d'un excès d'eau, ce qui distingue la cellulose de l'amidon. Les réactifs acides précédents, ajoutés à l'iode, transforment partiellement la cellulose en amyloextrine ou en hydrocellulose. En chauffant la cellulose à $+ 150^{\circ}$ elle ne se modifie pas ; au delà de cette température elle se colore en jaune puis en brun et se décompose finalement par carbonisation avec formation de produits de décomposition à l'état gazeux ou liquide, produits qui se forment aussi par la distillation sèche du bois ; de l'alcool méthylique ne se forme jamais par ce procédé. La cellulose est insoluble dans tous les réactifs neutres, acides et alcalins ; elle se dissout dans une solution ammoniacale d'oxyde de cuivre (liqueur de Schweitzer) ; tous les acides la précipitent. Elle est également soluble dans le sulfure de carbone en présence d'un alcali ainsi que dans un mélange d'une partie d'acide chlorhydrique concentré et d'une partie de chlorure de zinc. Elle présente une remarquable affinité pour les colorants acides. Son analyse chimique répond à la formule de composition : $(C^6 H^{10} O^3)_n$; cette formule est constituée par différentes molécules de glucose qui se sont polymérisées avec mise en liberté d'eau. Par l'hydrolyse, en chauffant avec de l'acide sulfurique dilué, elle fournit comme produit final le glucose ; cette condensation la rapproche de l'amidon, mais tandis que celui-ci donne par hydrolyse du maltose, la cellulose fournit dans certaines conditions, le cellose isomère du premier produit, dextrogyre, soluble dans l'eau, dédoublable lui-même par hydratation en deux molécules de glucose.

Avec différents acides la cellulose forme des éthers qui ont obtenu une grande importance au point de vue industriel ; mentionnons ici la nitrocellulose ou fulmicoton, l'acétate de cellulose, le xanthogénate de cellulose et la soie artificielle.

L'examen microscopique de la cellulose montre la forme de cellules à poils (*Gossypium*).

Elle doit répondre à la densité de 1,58.

De nos jours on comprend sous le terme de cellulose un complexe formé de cellosane, anhydride du cellobiose et isomère du maltose.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

- Chapitre I : Les larves et les insectes xylophages étudiés
Méthodes et Techniques générales
- Chapitre II : Les milieux de culture
- Chapitre III : Micro-organismes cellulophages isolés du
Cossus cossus Linné
- Chapitre IV : Microorganismes cellulophages isolés de
Sciapteron tabaniformis Rott.
- Chapitre V : Microorganismes cellulophages isolés de
Cerambyx scopolii Füssl
- Chapitre VI : Les microorganismes isolés de la lumière
de l'intestin chez les insectes étudiés
existent-ils dans les essences de bois où
vivent ces insectes ?
- Chapitre VII : Considérations générales sur la transforma-
tion de la cellulose chez certains insectes
xylophages.
-

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE I

Les larves et les insectes xylophages étudiés Méthodes et Techniques générales

CHAPITRE PREMIER

Les larves et les insectes xylophages Technique générale

A. Les larves et les insectes qui ont servi à notre étude.

Nous nous sommes adressés dans ce travail à des larves de *Lépidoptères* et de *Coléoptères* et à des *Coléoptères* parfaits. Parmi les premiers (*Lépidoptères*), nous avons limité notre choix à deux espèces : la larve du *Cossus cossus* LINNÉ (*ligniperda*) et celle de *Sciapteron tabaniformis* ROTT (*Sesia*). Parmi les insectes appartenant à l'ordre des *Coléoptères*, nous avons fait appel aux larves et aux insectes parfaits du *Cerambyx scopolii* FÜSSL (*Cerdo scopolii*). Nous dirons un mot ici de ces insectes, de leur récolte et de leur élevage au laboratoire.

Lépidoptères :

1^o *Cossus cossus* LINNÉ :

C'est un papillon de la famille des *Bombycidae* et de la tribu des *Cossidae*; la chenille vit dans l'intérieur de différents arbres mais principalement dans les saules; cette larve possède des caractères bien particuliers et ne peut prêter à confusion avec aucune autre larve xylophage; de plus elle dégage un liquide âcre, dont l'odeur se perçoit très nettement et qui lui sert à ramollir le bois; cette odeur nous a rendu service, alors que nous recherchions des *Cossus* dans les environs de *Strasbourg*. La grosseur de cette larve est variable suivant son âge, car elle met trois années pour arriver à se transformer en chrysalide; au début elle a la forme d'un petit doigt et vers la fin, elle peut atteindre la grosseur d'un doigt moyen et la longueur de 10 centimètres. Elle est de couleur brune ou carminée sur le dos, les parties latérales et ventrales sont jaunes; la tête est noir-brun et porte de longues et robustes mandibules avec

lesquelles elle essaie de saisir son adversaire. Elle est munie de seize pattes. La tête et chacun des anneaux sont garnis de poils fins disposés en bandes transversales.

La femelle pond ses œufs en juin ou juillet; ceux-ci sont déposés par paquets dans les crevasses des vieilles écorces, le plus souvent à la partie inférieure du tronc, non loin du sol. La chenille vit quelques semaines dans ce bois plus ou moins pourri et dès qu'elle a acquis une vigueur suffisante, elle s'introduit dans le bois sain ou elle trace des couloirs sinueux assez embrouillés, dont la section est elliptique; ceux-ci sont généralement remplis de sciure. Elle hiverne deux années sous cette forme larvaire et la métamorphose en chrysalide a lieu au mois de mai de la troisième année.

Nous avons eu l'occasion de recueillir un assez grand nombre d'échantillons de *Cossus cossus* dans les environs immédiats de *Strasbourg*, le long des ruisseaux bordés de saules à *La Robertsau*, à *Brumath*, etc... Généralement il nous a fallu creuser des troncs profondément pour arriver à les trouver; cependant à deux reprises nous eûmes la bonne fortune d'en récolter quelques représentants à leur sortie des galeries; nous avons aussi pu profiter d'abattages de saule et de débitage de bois infesté pour en recueillir.

L'élevage au laboratoire a été effectué dans des cages en bois recouvertes intérieurement de verre pour empêcher que les larves ne percent des trous dans les parois et ne s'enfuient par ce chemin; les parties latérales étaient constituées par un fin grillage métallique permettant l'accès de l'air; à la partie supérieure nous avons disposé un couvercle de verre; la boîte était garnie de sciure et de morceaux de bois; de temps en temps nous donnions à nos pensionnaires des pommes, ce qui constituait pour elles une nourriture de choix; nous avons ainsi réussi à en conserver pendant plus d'une année.

2^o *Sciapteron tabaniformis* ROTT (*Sesia*).

La larve est une chenille jaune blanc; sa tête est de couleur brun-noirâtre; la ligne dorsale est sombre et parsemée de poils isolés et de teinte sombre; elle habite les peupliers et les saules; le plus souvent on la trouve dans les excroissances des branches et des pousses; elle se chrysalide après le deuxième hiver de son existence larvaire sans former de cocon; elle séjourne alors dans les fines galeries qu'elle a creusé auparavant. Nous avons réussi à l'acclimater au laboratoire et pour cela nous nous sommes servi de récipients en verre au fond desquels nous avons disposé de la terre ou du sable légèrement humide: nous avons piqué dans cette terre les morceaux de branche qui contenaient l'insecte; on a ainsi pu les garder vivants pendant plusieurs mois.

Coléoptères :

Cerambyx scopolii FÜSSL (*Cerdo scopolii*) :

Nous nous sommes adressé à la fois à l'insecte parfait et à sa larve. C'est un insecte de l'ordre des Coléoptères et de la tribu des *Cerambycidae*, on l'appelle communément le *Capricorne* du chêne. Il est de couleur noir brillant; son corselet possède sur chacun de ses bords latéraux une sorte de tubercule épineux tourné en dehors. Les antennes sont plus longues que le corps chez les mâles; les yeux sont très convexes et leurs facettes sont bien visibles à l'œil nu. Les élytres sont rétrécis et finement chagrinés en leur partie postérieure; à leur extrémité une épine suturale est visible.

La larve, dont les dimensions sont un peu supérieures, est formée de segments bien dégagés dont sept sont munis de plaques dorsales chagrinées; elle est de couleur de cire sur le corps; la tête est petite, brune, aplatie et chitineuse. A la partie antérieure du premier segment thoracique une bande transversale brunâtre est visible. Les antennes comptent trois articles; elles sont très fines; les pattes sont peu apparentes et rudimentaires. Cet insecte est assez commun; il essaime en juin ou juillet; après l'accouplement les œufs sont déposés dans des anfractuosités, trous, blessures du chêne à écorce épaisse; la larve se développe et pénètre à travers les couches corticales puis dans le bois sain; pendant son séjour elle creuse des couloirs sinueux de dimension appropriée à sa taille; son corps se développe durant trois ou quatre ans. A la fin de cette période la larve atteint la taille d'un index humain, à ce moment elle gagne généralement le cœur du bois qui est traversé dans tous les sens; elle arrive à se ménager une sorte de niche garnie de débris ligneux; dès que l'insecte parfait est formé, il gagne l'extérieur à travers les galeries larvaires. Cet insecte est facilement décelable dans les arbres car, au moment de la végétation, on constate aux orifices des galeries des écoulements de sève et de plus une sciure brunâtre ou jaunâtre qui s'échappe à l'extérieur. Il nous est arrivé d'observer le soir l'insecte ailé dégageant avec difficulté ses antennes des ouvertures pour se libérer. Sa capture ne nous a pas donné de difficulté; pour récolter les larves nous avons du sectionner sur des chênes abattus des branches infestées. Ici aussi nous avons eu recours à l'élevage en cage comme pour le *Cossus cossus*; nous avons pu garder vivant l'insecte parfait pendant plusieurs semaines.

Tels sont les insectes auxquels nous avons eu recours pour notre étude; les raisons pour lesquelles nous les avons choisis sont les suivantes :

Ces insectes ou leurs larves sont de grande taille; de cette façon, le travail nécessité par le prélèvement du tube digestif sera facile.

Ils constituent des espèces bien définies, ne pouvant être confondues avec d'autres insectes xylophages; leur identification est aisée.

La grande durée du stade larvaire dans l'évolution permet de garder ces larves au laboratoire pendant un temps assez long, identiques à elles-mêmes.

Par les lésions externes qu'ils déterminent sur les arbres qu'ils habitent, ils sont faciles à déceler; leur capture et leur élevage sont relativement simples.

Chacune des espèces étudiées vit sur une essence de prédilection; nous avons affaire ici à trois espèces de bois : Saule, Peuplier, Chêne.

B. Technique générale.

1^o Examen des déjections :

Pour l'examen des déjections nous avons employé deux procédés différents qui nous ont donné, nous le dirons dès à présent, des résultats peu fructueux.

Tout d'abord nous avons prélevé les larves et les insectes nourris au moyen de leur aliment ligneux normal et spécifique et par pression sur l'abdomen au moyen d'une pince nous avons obtenu l'expulsion de déjections que nous avons recueilli en boîtes de PETRI stérilisées; une partie nous a servi pour l'examen direct, l'autre a étéensemencée sur divers milieux expérimentaux.

Examen direct :

A l'examen direct effectué entre lame et lamelle à l'état frais et au moyen de frottis obtenus par émulsion des matières fécales en eau physiologique et colorés par des colorants d'aniline phéniqués, nous avons pu constater la présence de nombreuses bactéries appartenant au groupe coli et de nombreux coccis. D'autre part ces préparations nous ont révélé la présence de cellules ovoïdes présentant à l'examen plus détaillé les caractères de l'*Oidium lactis* FRES.

Cultures :

Les cultures obtenues sur les divers milieux acides nous ont donné dans certains cas une poussée luxuriante de l'*Oidium lactis*; nous avons, en outre, obtenu toute une série de champignons inférieurs appartenant aux classes des Oomycètes et des Ascomycètes, organismes qui, à l'étude des propriétés biologiques nous ont paru sans intérêt pour notre travail.

Sur les milieux alcalins, la poussée des bactéries a été faible en général et nous n'avons pas pu déceler la présence d'organismes différents de ceux dont nous venons de parler.

Autre procédé de récolte des déjections :

Le deuxième procédé employé a été le suivant : les chenilles, larves et insectes bien nourris au préalable ont été lavés soigneusement au moyen d'une solution de lysoforme diluée; ensuite passés dans de l'eau distillée stérilisée afin d'éliminer les germes extérieurs saprophytes ou parasites de la peau ou du tissu épithélial. Ces chenilles ainsi purifiées ont été placées dans des boîtes de Petri stérilisées et on a procédé au bout de 24 heures au prélèvement des déjections qui ont été traitées comme précédemment. Afin de contrôler la rigueur de notre technique de stérilisation externe des insectes, nous avons fait des essais avec différentes espèces tuées au préalable et stérilisées de la même façon que les chenilles vivantes nous fournissant les matières fécales; ces chenilles tuées et stérilisées ont été mises en contact avec différents milieux acides et alcalins utilisés habituellement et ces cultures sont toujours restées stériles avant que la putréfaction ne fasse son œuvre. Le procédé de récupération des matières fécales, l'examen direct et la culture de ces déjections ne nous ont pas donné des résultats plus favorables que plus haut.

Afin de mener notre travail à bien, nous avons été amené à modifier profondément notre technique. Nous avons opéré des prélèvements du tube digestif de l'insecte, procédé qui nous a enfin donné des résultats satisfaisants.

2^e Mode opératoire pour le prélèvement aseptique du tube digestif :

La larve ou l'insecte est prélevé et placé dans un récipient renfermant du chloroforme. Nous faisons usage ensuite d'un jeu de trois boîtes de PETRI stérilisées : dans la première on introduit de l'eau oxygénée, dans la seconde, une solution faible de lysoforme et dans la troisième de l'eau distillée stérilisée. La larve ou l'insecte mort est placé dans la première boîte où il est lavé soigneusement à l'eau oxygénée; la même opération est répétée dans la solution de lysoforme et dans l'eau distillée stérilisée.

Ces différentes opérations ont pour but de débarrasser l'insecte des nombreux germes saprophytes et parasites qui peuvent se trouver à la surface de son corps. Il est ensuite tamponné stérilement à l'aide de papier-filtre stérilisé, placé dans une boîte de Pétri stérile et il est prêt pour la dissection. Afin de nous entourer de toutes les

garanties possibles et pour éviter la pénétration des germes extérieurs, nous opérons cette dissection au moyen d'instruments stérilisés. Elle a lieu dans un appareil que nous décrivons ci-dessous.

Petite chambre à dissection stérilisable :

L'appareil (fig. 1) se compose d'une boîte métallique cylindrique, munie de deux ouvertures latérales auxquelles peuvent être fixés des manchons de flanelle épaisse; la capacité de cette chambre permet le libre mouvement des mains en son intérieur. Elle est fermée au moyen d'un couvercle en verre qui laisse pénétrer la lumière.



(Fig. 1) — Chambre à dissection

Au fond de cette boîte nous avons placé un morceau de liège permettant la fixation des insectes au moyen d'épingles. Les manchons étant bouchés au moyen de coton et leurs orifices fermés par des cordons, l'appareil est enveloppé de papier et stérilisé à l'autoclave à la température de $+ 120^{\circ}$ pendant 20 minutes.

Dissection proprement dite :

Après avoir soigneusement stérilisé nos mains et nos bras par lavages au formol et à l'alcool à 95° , nous enfilons des gants de caoutchouc stérilisés et un aide nous passe les manchons et nous les fixe au bras. Les instruments stérilisés sont introduits aseptiquement dans l'appareil ainsi que la boîte de PÉTRI contenant l'insecte à opérer.

Celui-ci est fixé au moyen d'épingles sur notre liège et par une dissection fine en commençant par la tête, nous enlevons la peau et nous découvrons le tube digestif que nous plaçons dans une boîte de PÉTRI stérile. Ainsi croyons-nous avoir le maximum de garanties contre des souillures accidentelles étrangères. La boîte de PÉTRI contenant les prélèvements est alors sortie de la chambre à dissection.

Nous répartissons les prélèvements en quatre lots :

1^o Le premier est réservé à l'examen direct sans coloration.

2^o Le deuxième sert à effectuer des préparations colorées par des colorants tels que le bleu lactique ou le triple colorant de GUEGUEN et à la confection de frottis qui sont fixés et colorés au moyen de colorants d'aniline phéniqués.

3^o Le troisième est mis à fixer à l'acide osmique ou au microformol et est destiné à l'exécution de coupes en paraffine. Les coupes sont faites au microtome de MINOT.

4^o Le quatrième constitue le lot d'ensemencement qui servira à faire des cultures sur divers milieux.

3^e Coloration des coupes :

Nous avons fait appel à diverses méthodes; nous décrivons ici celles qui nous ont donné satisfaction :

Glychemalun de Mayer : Nous avons fait usage de ce colorant pour la coloration des éléments nucléaires.

Hématoxyline au fer de Heidenhain : On effectue le mordantage pendant 24 heures dans une solution d'alun de fer à 4%. Après lavage on transporte dans le bain suivant :

Eau distillée	80 cc.
Alcool 95°	10 gr.
Glycérine	10 gr.
Hématoxyline	1 gr.

La différenciation s'effectue sous le microscope dans l'alun de fer jusqu'à la teinte voulue; on lave, on déshydrate et on monte dans le baume de Canada.

Coloration des Bactéries : Les coupes sont colorées pendant 10 minutes avec une solution de bleu de méthylène (LÖFFLER). on lave à grande eau, on différencie 30 secondes à 1 minute dans une solution d'acide acétique à 50%; on lave à l'eau; on déshydrate suivant la méthode courante et on monte dans le baume.

Première coloration des champignons inférieurs : Les coupes histologiques sont colorées par une solution de bleu de méthylène (LÖFFLER) 1 heure à 2 heures; on contrecolore ensuite au moyen

d'éosine; on lave, on déshydrate et on monte. Les filaments sont colorés en bleu très net; les autres éléments apparaissent en rouge.

Deuxième coloration : On fixe les objets dans la solution de MÜLLER au formol :

Sublimé	5 gr.
Bichromate de Potassium	2,5 gr.
Sulfate de Sodium	1 gr.
Formaline	10 gr.
Eau	90 cc.

On colore pendant 24 heures avec la solution de GIEMSA diluée au dixième; on lave à l'eau distillée; on différencie pendant un temps très court dans l'acide acétique à 25%; on lave énergiquement à l'eau; on déshydrate dans l'alcool et on monte dans le baume.

Les noyaux sont colorés en bleu, les filaments mycéliens apparaissent en bleu faible; les appareils reproducteurs prennent une coloration verdâtre; le reste se colore en rouge.

4^e Essais d'isolement des germes :

Nous avons déjà mentionné dans ce chapitre l'exposé de nos recherches effectuées suivant la technique de PORTIER (58), c'est-à-dire l'examen et l'étude des déjections des insectes et des larves envisagés et les essais de culture par ensemencement de ces matières fécales ; nous avons ensuite eu recours à la dissection de la chenille préalablement débarrassée de ses germes épithéliaux, à l'isolement du tube digestif dans la chambre à dissection stérile, au prélèvement de celui-ci.

L'examen des préparations fraîches et fixées, ainsi que les coupes histologiques colorées nous ont donné certaines directives pour la continuation et l'orientation de nos travaux, mais pour la caractérisation, l'étude botanique et biologique des germes et aussi pour l'étude spéciale des processus de dégradation cellulosique imputables aux microorganismes, il a été obligatoire de les cultiver, de les isoler les uns des autres, afin d'examiner en cultures pures leurs propriétés spécifiques au point de vue morphologique et biologique. De plus, en les couplant de manière appropriée sur des milieux de composition connue, nous avons pensé, par l'identification et le dosage des produits formés au cours de ces cultures, en quelque sorte mesurer leur pouvoir résultant de leur association et les avantages en résultant pour leur hôte.

Méthodes de séparation :

Les diverses méthodes de séparation auxquelles nous avons eu recours sont les suivantes : l'examen direct nous ayant montré que nous avions affaire à deux catégories bien délimitées de micro-organismes : champignons inférieurs et bactéries, afin de séparer ces deux grands groupes nous avons dû avoir recours à plusieurs procédés :

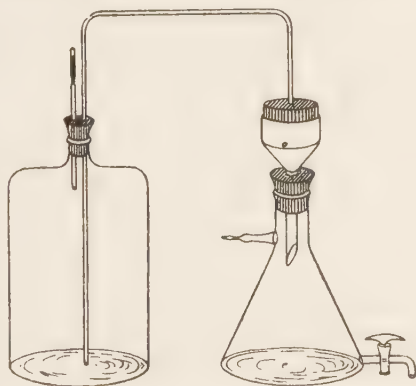
Ces méthodes utilisent les cultures à des hautes températures, les ensemencements sur plaques en stries ; les dilutions successives dans les liquides nutritifs. Nous leur avons préféré les procédés par lavage et filtration dans la plupart des cas difficiles.

Première méthode utilisée pour la séparation par lavage et filtration :

Ce procédé n'est applicable que lorsque l'on veut séparer une bactérie suffisamment ténue pour passer à travers un filtre ; nous nous trouvons la plupart du temps dans ce cas :

D'une part dans une fiole de cinq litres nous avons placé une certaine quantité de sérum physiologique ; cette fiole est munie d'un bouchon percé de deux trous ;

par l'un passe un tube droit, court d'aération, bouché à la ouate ; par l'autre trou la fiole est reliée au moyen d'un tube de verre deux fois coudé à la partie supérieure d'une fiole de lavage constituée comme suit : nous nous sommes servi d'un flacon d'Erlenmeyer utilisé dans la pratique courante pour la filtration par le vide et d'un entonnoir à filtration rapide ; le flacon d'Erlenmeyer possède cette particularité que en dehors de l'ajutage pouvant le relier à



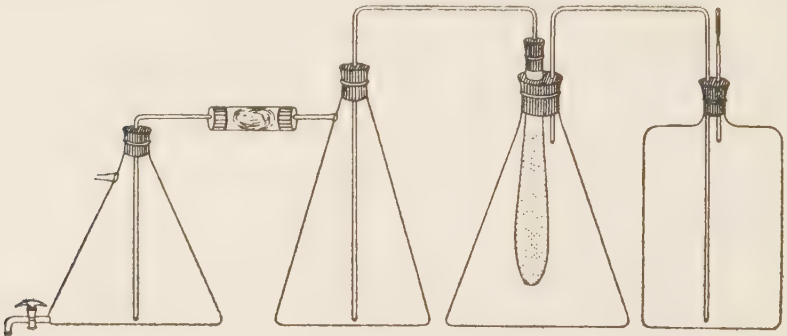
(Fig. 2) — Appareil pour la séparation des germes par filtration.

la trompe à vide, il présente à sa base un deuxième ajutage, muni celui-là d'un robinet en verre ; il est bouché au moyen d'un bouchon percé qui reçoit l'entonnoir à filtration rapide dans lequel nous avons disposé une rondelle de papier *Chardin* à gros grains ; le tube venant du flacon de sérum physiologique s'y engage jusqu'à la surface, un petit peu au-dessus du papier-filtre ; on bouche l'orifice de l'entonnoir à filtration rapide et l'appareil ainsi

monté est rigoureusement stérilisé. Le mycélium du champignon est introduit aseptiquement dans l'entonnoir ; en ouvrant la trompe à vide très doucement, on fait arriver le sérum sur le mycélium et on produit ainsi un lavage de celui-ci ; dès que le flacon d'*Erlenmeyer* est rempli d'eau physiologique, on ferme la trompe à vide et on ouvre le robinet inférieur afin d'évacuer le liquide ; on renouvelle cette opération de façon à obtenir un lavage se prolongeant au moins 6 heures ; les bactéries sont entraînées à travers le filtre et le mycélium reste sur celui-ci ; de cette façon, si le lavage a été assez poussé on a séparé le champignon de la bactérie (figure 2).

Modification du procédé précédent :

Nous effectuons la culture dans un ballon à large ouverture ; après que l'on a constaté une croissance normale on introduit asepti-



(Fig. 3)

Appareil pour la séparation des germes par filtration (Fuhrmann modifié).

quement dans ce ballon une bougie en terre poreuse à grains très larges, laquelle est munie à sa partie supérieure d'un bouchon à deux trous pouvant s'appliquer exactement sur le ballon ; un trou du bouchon aboutit au centre de la bougie, l'autre à l'extérieur de celle-ci, dans le ballon même ; il est muni d'un tube de verre venant d'une fiole de cinq litres contenant du sérum physiologique stérilisé ; le trou central, muni d'un tube deux fois coudé, conduit à un flacon d'*Erlenmeyer* à vide lui aussi qui est mis en relation par son ajutage avec un autre flacon d'*Erlenmeyer* possédant deux ajutages, ceci au moyen d'un tube de verre de gros diamètre contenant du coton et bouché à ses deux extrémités. Le dernier flacon d'*Erlenmeyer* sert d'aspirateur à vide ; on le relie à une trompe ; par ce procédé l'eau physiologique, pénétrant dans le ballon, entraîne à travers la bougie les bactéries ; celles-ci sont recueillies aseptiquement dans le coton où elles étaient retenues. Dans le

ballon et sur les parois de la bougie après un lavage prolongé, nous avons pu isoler le champignon dépourvu de bactéries. (Fig. 3) (Appareil de *Fuhrmann* modifié) (21).

5^e Dosage de la cellulose dans les milieux de culture :

Les méthodes utilisées pour le dosage de la cellulose se subdivisent en deux groupes : méthodes qui ont pour objet de déterminer la teneur en cellulose brute d'une substance et méthodes servant à doser la cellulose pure.

En ce qui concerne le dosage de la cellulose brute la plus vieille est la méthode de WEENDE (75) basée sur l'action de l'acide sulfurique très dilué et de la lessive de potasse diluée. Diverses modifications de ce procédé ont été données par HELLRIEGEL et LUKANUS (29), HOFMEISTER (30), KUHN, VON KNIRIEM (38), GRANDEAU (24), WICKE (76), O. SWEENEY (68), Cornelia KENNEDY, FORBES et MENSCHING (20), DMOCHOWSKI et TOLLENS (18), KALNING (35). D'autres auteurs ont donné des simplifications de l'ancienne méthode de WEENDE ; citons parmi eux : HOLDEFLEISS (31), WATTENBERG (74), GRANDEAU (24), GRÉGOIRE et CARPIAUX (25), BIDWELL (11).

Parmi les autres méthodes, celle qui mérite de retenir l'attention a été donnée par KÖNIG (39) qui procède par le contact avec un mélange de glycérine et d'acide sulfurique à la température de 133°—135° dans le réfrigérant ascendant.

Dans ces méthodes on ne se contente pas de peser la cellulose après traitement, mais on détermine le poids des cendres obtenues par incinération du produit final et la cellulose brute est donnée par la différence entre la pesée primitive et celle des cendres.

Les différentes méthodes de dosage de la cellulose pure sont des procédés par le chlore, telle que la méthode de SCHULZE (64), par l'acide chlorhydrique, le chlorate de potassium et la lessive de soude diluée comme la méthode de HOFMEISTER (30). Enfin SIMON et LOHRISCH (65) ont donné un moyen de doser rapidement la cellulose pure qui s'appuie sur le fait que les substances incrustantes sont décomposées par les alcalis en fusion, tandis que la cellulose se trouvait dissoute mais non détruite; KÖNIG obtient de la cellulose pure en partant de la cellulose brute et en oxydant la lignine par l'eau oxygénée et l'ammoniaque; le résidu est traité par la liqueur de SCHWEITZER qui ne dissout que la cellulose; la partie insoluble est de la cutose. La cellulose peut être précipitée facilement dans la liqueur de SCHWEITZER par action de l'alcool à 80°.

En ce qui concerne nos procédés de dosage disons tout d'abord que nous avons employé de la cellulose pure POULENC que nous avons

passé à l'alcool et à l'éther et desséché à l'étuve avant de la peser, pour la répartir dans nos milieux. Nous avons disposé dans ces milieux un poids connu de cellulose pure qui a été le plus souvent de 1 gramme.

Après l'action des bactéries ou des champignons, lorsque nous avons recherché quel était le poids de cellulose restante dans le milieu, nous avons usé de deux procédés dont nous avons comparé les résultats sur des quantités de cellulose connues.

D'une part nous avons employé la méthode indiquée par HELLER (28) qui est la suivante : la cellulose est dissoute dans la liqueur de SCHWEITZER et précipitée par l'acide chlorhydrique, lavée sur un filtre taré, desséchée et pesée.

D'autre part nous avons fait usage de la méthode donnée par DMOCHOWSKY et TOLLENS (18) : la cellulose est traitée par de l'acide sulfurique à 1,25 pour 100, puis de la lessive de potasse à 1,25%. L'acide sulfurique et la potasse dissolvent tous les produits de dégradation en respectant la cellulose; elle est ensuite disposée sur un filtre; on ajoute de l'acide azotique de densité 1,15, de manière à bien recouvrir la cellulose; on met sur le bain-marie à 80° et on chauffe pendant 1 heure; la substance est devenue jaune; on la place dans un filtre de GOODGE; on filtre à la trompe; on ajoute sur le dépôt de l'eau; on chauffe jusqu'à ce que la coloration jaune ait disparu complètement; on filtre; on ajoute au dépôt de l'alcool, puis on lave à l'éther; on sèche à 110° jusqu'à poids constant, on pèse, on calcine la différence entre la première pesée et le poids des cendres donne la cellulose pure dépourvue de cendres. On multiplie le résultat par le coefficient 1,1.

Ces deux méthodes, dans nos nombreux essais de comparaison nous ont toujours donné des résultats analogues; c'est pourquoi nous avons cru bon d'employer pour notre expérimentation la deuxième méthode.

Dans chaque expérience nous avons employé, à côté des culturesensemencées sur cellulose, des milieux cellulosés vierges de même nature et qui ont été exposés aux mêmes conditions et manipulations. Ces milieux nous ont servi de témoins pour les contrôles dans le dosage de la cellulose.

CHAPITRE II

Les milieux de culture

CHAPITRE II

Les milieux de culture

Les milieux de culture que nous avons employé au cours de nos recherches peuvent être divisés en deux grands groupements : tout d'abord les milieux ordinaires usités dans les laboratoires de bactériologie et de mycologie; enfin des milieux spéciaux que nous appellerons milieux électifs contenant une certaine proportion de cellulose :

Milieux usuels :

Nosensemencements ont été effectués sur les milieux suivants :

a) *Milieux à réaction acide :*

1^e Milieux liquides : liquide de *Raulin* normal, liquide de *Raulin* glucosé, milieu de *Sabouraud* (sans gélose), liquide de *Raulin* maltosé.

2^o Milieux solides : pommes de terre, carottes, gelée d'amidon, milieu de *Raulin* gélosé à 5%, milieu de *Sabouraud* de conservation, milieu de *Sabouraud* d'épreuve. jus de carrote gélosé, jus de pomme de terre gélosé glycérimé.

Nous avons fait appel au liquide de *Raulin* parce que ce milieu est de composition nettement définie et qu'il est favorable à la culture de nombreuses espèces de champignons microscopiques. Nous avons eu recours aussi au milieu de *Sabouraud* étant donné la bonne croissance de nombre d'espèces cryptogamiques sur ce substrat.

b) *Milieux à réaction neutre :*

Liquide de *Raulin* neutre, liquide de *Raulin* neutre solidifié par la gélose.

c) *Milieux à réaction alcaline :*

1^o Milieux liquides : bouillon de viande, bouillon de viande glucosé, bouillon de viande maltosé, bouillon de viande glycérimé.

2° Milieux solides : gélose au bouillon, gélatine au bouillon.

La plupart de ces milieux ont été préparés suivant les formules classiques; pour le jus de carotte gélosé et le jus de pomme de terre gélosé glycérimé seulement, nous jugeons utile de donner ici la formule et le mode de préparation :

Milieu au jus de carotte gélosé :

Nous nous sommes adressé à ce milieu étant donné sa grande valeur nutritive et les bons résultats qu'il nous a donné pour la culture de la plupart des champignons inférieurs.

Nous avons préparé une décoction de carotte et ainsi obtenu un jus de carotte renfermant tous les principes nutritifs de cette plante. La concentration du jus est la suivante : une partie de carotte découpée en minces rondelles pour deux parties d'eau. Nous avons adjoint à ce jus de carotte du saccharose pur crist. *Poulenc* et une quantité de gélose suffisante pour obtenir la solidification après refroidissement.

Ci-dessus la formule de ce milieu :

Saccharose pure cristallisée *Poulenc* 5 gr.

Gélose : Q. S. pour solidification du milieu

Jus de carotte 100 cc

Le milieu a été stérilisé à l'autoclave à 110° pendant une demi-heure.

Jus de pomme de terre gélosé :

Des pommes de terre sont pelées et découpées en minces rondelles. On fait cuire une partie de pommes de terre dans deux parties d'eau; on laisse macérer pendant trois ou quatre heures. On filtre sur toile. On ajoute au filtrat son volume de bouillon glycérimé à 3% et 2 pour 100 de glucose. On solidifie en adjoignant 20 grammes pour 100 de gélose que l'on a, au préalable, fait macérer; on fait dissoudre à l'autoclave, on répartit dans les récipients servant pour la culture et on stérilise à l'autoclave à + 110° pendant 30 minutes.

Ce milieu constitue un aliment de choix pour certaines bactéries.

Sous l'influence de quelques remarques de WINOGRADSKY (77) nous avons été amené à faire usage de milieux spéciaux électifs à base de cellulose.

Milieux de culture électifs à base de cellulose :

WINOGRADSKY fait remarquer que les milieux ordinaires employés pour l'étude des microorganismes du sol ne conviennent pas

entièrement; sur ces substrats cultivent en abondance des germes de nature banale qui ne peuvent intéresser qu'à titre documentaire et non les germes spécifiques à qui sont redevables les phénomènes importants, lesquels germes sont étouffés par des microorganismes sans intérêt.

Il nous a été donné aussi de remarquer que les milieux de culture ordinaires voyaient croître en abondance une espèce ou deux de caractère banal qui envahissaient bientôt le milieu.

Nous avons pensé que sur milieux à la cellulose, les germes qui prédomineraient seraient ceux possédant des propriétés assimilatrices vis-à-vis de la matière cellulosique.

Nous croyons, guidés par les travaux d'OMELIANSKY (54) et de PRINGSHEIM (59) et par nos expériences personnelles, devoir diviser l'énumération de nos milieux de culture en deux parties : étant donné que la fermentation cellulosique par les bactéries donne naissance à des produits de dégradation occasionnant une acidification du milieu, fait nuisible pour ces organismes; afin d'obvier à cet inconvénient, les milieux servant à la culture des germes bactériens doivent donc contenir des substances douées de propriétés neutralisantes vis-à-vis des acides naissant au cours de l'assimilation bactérienne. Un autre point venant en question qui, dans des travaux antérieurs effectués par ELLENBERGER (I^{re} partie, 25), a été vérifié par nous, nous a conduit de même à séparer ces deux groupes. Les bactéries cellulophages attaquent de préférence la cellulose dans des milieux renfermant comme source d'azote des substances organiques (matières fécales) et des sels de nitrates; par contre, dans ces milieux un grand nombre de champignons inférieurs se contentent de l'aliment azoté et négligent la cellulose; ces organismes produisent une fermentation cellulosique électivement sur des milieux renfermant des sels ammoniacaux et de la cellulose seule.

Milieux pour la culture des bactéries :

Madame KHOUVINE-DELAUNAY (36) avait attiré l'attention sur le fait suivant : le bacille qu'elle avait isolé de l'intestin humain et qui était une bactérie cellulophage préférait à toute autre source d'azote les produits dégradés qu'il trouvait dans l'extrait de matières fécales. Il nous a été donné de vérifier ce fait, en ce qui concerne la bactérie cellulophage isolée par nous du tube digestif d'un insecte xylophage.

Nous citons ci-dessous les divers milieux dont nous avons fait usage :

Milieux pour la culture des bactéries :

Milieu de Van Iterson :

Ce milieu constitue un aliment pour les bactéries sans action dénitrifiante.

Eau de robinet	100 cc.
Papier Berzelius trituré avec de l'eau	2 gr.
Craie	2 gr.
Phosphate dipotassique	0 gr. 05
Chlorure d'ammonium	0 gr. 1

Milieu de Grænewege :

Eau de robinet	100 cc.
Papier Berzelius	0 gr. 5
Chlorure d'ammonium	0 gr. 1
Phosphate dipotassique	0 gr. 05
Carbonate de calcium	1 gr.

Milieu de Both et Scales :

Sulfate d'ammonium	0 gr. 50
Phosphate dipotassique	0 gr. 05
Sulfate de magnésie	1 gr.
Carbonate de sodium	0 gr. 50
Carbonate de potassium	2 gr.
Cellulose pure	3 gr.
Eau de robinet	1000 gr.

Milieu à l'agar-cellulose pour plaques :

Eau de robinet	100 gr.
Agar	1 gr. 50
Cellulose chimiquement pure	0 gr. 3
Carbonate de calcium	0 gr. 1
Nitrate de sodium	0 gr. 2
Sulfate de magnésie	0 gr. 1
Chlorure de sodium	0 gr. 1
Phosphate dipotassique	0 gr. 1

D'autre part, nous résolûmes d'adopter le milieu de culture de KHOUVINE contenant l'extrait de matières fécales pensant que cultivées sur ce milieu nos bactéries se trouveraient dans des conditions très voisines de celles réalisées dans le tube digestif des insectes.

Milieu de Khouvine-Delaunay :

Phosphate dipotassique	1 gr.
Chlorure de sodium	1 gr.
Peptone pancréatique	1 gr.
Carbonate de calcium.....	2 gr.
Eau	750 cc.
Extrait fécal	250 cc.
Cellulose	10 gr.

L'extrait fécal est ainsi obtenu : On délaie dans 8 à 10 parties d'eau distillée 1 partie de matières fécales et on filtre sur papier Laurent.

Au début le liquide filtré est trouble ; on le remet sur le filtre jusqu'à ce qu'il soit parfaitement clair. La filtration est très lente ; le filtrat est d'abord coloré en marron clair, mais il fonce à l'air. On le stérilise à l'autoclave à $+110^{\circ}$ pendant $\frac{1}{2}$ d'heure. Durant la stérilisation, il se forme un précipité qu'on laisse déposer pour n'employer que le liquide clair.

Milieux spéciaux

Au cours de nos recherches, nous avons été amené à composer différents milieux de culture qui nous ont servi d'un côté pour l'étude morphologique des microorganismes cellulophages isolés de nos insectes, d'autre part pour l'examen des propriétés biologiques diverses.

C'est ainsi que nous avons employé pour l'étude des Mucorinées les milieux azotés suivants :

Milieu nitraté :

Eau	1000 cc.
Saccharose	50 gr.
Nitrate de potasse	2 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.

Milieu ammoniacal :

Eau	1000 cc.
Saccharose	50 gr.
Sulfate d'ammonium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.

Milieu à l'ovalbumine

Eau	1000 cc.
Glucose	30 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.
Ovalbumine en cubes	Q. S.

Milieu peptoné

Eau	1000 cc.
Glucose	30 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.
Peptones.....	5 gr.

D'autre part, pour l'étude de l'action lytique vis-à-vis de la cellulose nous avons préparé les milieux suivants :

Milieu pauvre en matières azotées

Eau de robinet	1000 cc.
Chlorure d'ammonium	0 gr. 5
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Nitrate d'ammonium	0 gr. 5
Phosphate monopotassique	0 gr. 2
Cellulose pure Poulenc râpée	10 gr.

Milieu de Khouvine-Delaunay modifié

Eau	850 cc.
Extrait de matières fécales	250 cc.
Chlorure d'ammonium	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Cellulose pure Poulenc râpée	10 gr.

Culture des Fusarium

Pour la culture des Fusarium, nous avons employé les méthodes indiquées par APPEL et WOLLENWEBER (3) et pu constater que pour l'identification et la fixation d'une espèce, il est absolument nécessaire de se tenir strictement à ces méthodes, étant donné le manque d'appareils reproducteurs sexuels dans ces genres. Les caractères

spécifiques sont extrêmement réduits et il convient d'employer toutes les données d'une technique méthodique établie si minutieusement par les auteurs cités.

C'est pour ces raisons que nous avons effectué des cultures :

- 1^o Sur des tiges de pomme de terre et de fève (*Vicia faba*).
- 2^o Sur des fruits tels que banane et pomme.
- 3^o Sur des tubercules de pomme de terre et des pivots de carotte.

Tous ces parties de végétaux sont divisées suivant les besoins et introduites dans des tubes ou tous autres récipients de culture. Sur les tiges on a ajouté une petite quantité d'eau et suivant les cas 2 % de sucre et de l'acide tartrique jusqu'à faible acidité.

Les récipients sont fermés stérilement au moyen de coton et stérilisés à l'autoclave.

En outre nous avons employé les milieux minéraux suivants :

Eau	1000 cc.
Nitrate d'ammonium	20 gr.
Phosphate dipotassique	10 gr.
Sulfate de magnésie	5 gr.
Glucose	100 gr.
Gélose	10 gr.

Pour l'étude de l'action cellulolytique de ces organismes, on a eu recours au milieu minéral suivant :

Eau	1000 cc.
Cellulose pure Poulenc râpée	10 gr.
Chlorure d'ammonium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.

Pour obtenir des cultures luxuriantes, nous avons fait appel au milieu végétal ci-dessous :

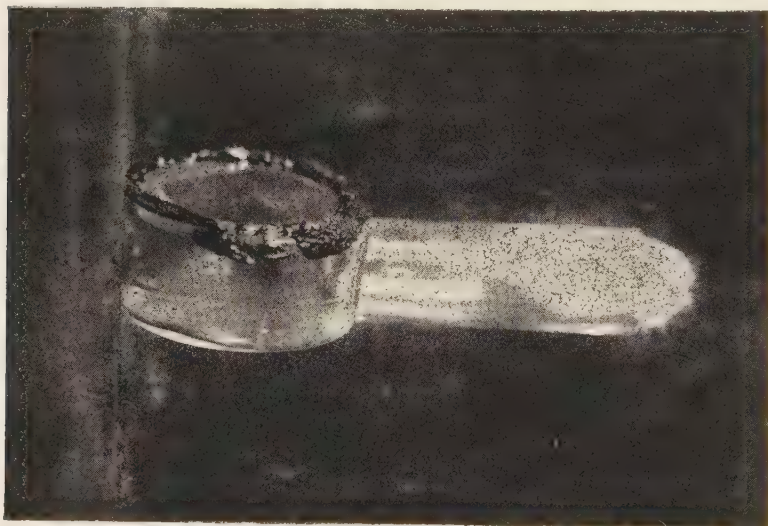
Jus de pomme de terre gélosé

Jus de pomme de terre (2 /1)	1000 cc.
Glucose	100 gr.
Acide tartrique	5 gr.
Gélose	15 gr.

L'acide tartrique est ajouté après stérilisation afin d'éviter l'hydrolyse de la gélose.

Cultures en gouttes pendantes

Pour observer l'évolution des appareils conidiens et la croissance du mycélium, suivant les besoins, nous avons introduit des coupes de plantes dans des cellules de VAN TIEGHEM ; ces cultures étaient de courte durée, puisque 8 jours plus tard des inconvénients résultant de l'évaporation et du manque de nourriture interviennent. Pour ces raisons nous avons employé un récipient spécial (Fig. 4) décrit lors de l'étude du *Fusarium* isolé de la larve de *Cossus cossus*. Cet appareil nous a permis d'observer au mieux la croissance des *Fusarium* en étude, spécialement la formation des filaments aériens



(Fig. 4) — Boîte de Borrel pour cultures en goutte pendante.

ou immergés. Ces caractères nous ont été fort utiles pour la différenciation des diverses espèces. En outre nous avons apporté un soin tout particulier dans l'étude de la formation des conidies, de leur insertion et de leur aspect, la présence et le mode de production des chlamydospores.

Il ne faut pas oublier dans ces recherches l'aspect et la coloration que ces organismes donnent sur les différents substrats. Une question importante, dans cette étude, est la comparaison entre cultures exposées à la lumière diffuse et cultures placées à l'obscurité. La température n'est pas non plus négligeable.

C'est en suivant ces techniques que nous sommes arrivés à fixer et à identifier nos espèces.

Neutralisation des milieux

Nous avons mesuré la réaction de nos milieux de culture et ajusté ceux-ci au moyen de la notation en pH suivant la méthode colorimétrique de SÖRENSEN modifiée par CLARK et LUBS (16).

Comme tampons, nous nous sommes servi de Phtalate acide de potassium N/5, de phosphate acide de potassium N/5, d'acide borique N/5 et de chlorure de potassium N/5.

Les indicateurs employés ont été les suivants : Bleu de thymol ; bleu de bromophénol, rouge de méthyle, pourpre de bromocrésol, bleu de bromothymol, rouge de phénol, rouge de crésol, O-crésol-phtaléine.

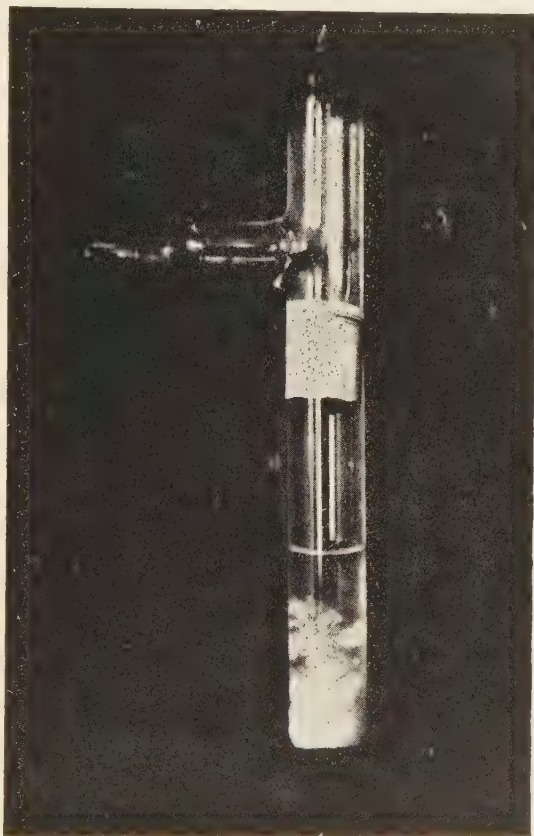
Les milieux ont été filtrés et refroidis ; toutes nos mesures ont été effectuées sur 5 cc. de milieu additionné de X gouttes d'indicateur dans des tubes isodiamétriques en verre neutre.

Pour faire varier la réaction de nos milieux, nous ne nous sommes pas adressé à la soude qui présente un sérieux inconvénient pour le développement des cultures (DESCOURAUX (17)) mais à la potasse

N/20 et à l'acide chlorhydrique N/20. Afin d'éviter les erreurs causées par le trouble des solutions et pour mieux apprécier les teintes nous avons fait usage d'un comparateur.

Les milieux de culture dont nous avons parlé ont été employés à la fois pour la pratique des cultures en aérobie et en anaérobie.

Pour les cultures en anaérobiose, nous avons employé des tubes de Roux (Fig. 5) et quand il s'agissait de grande quantité de milieu, nous nous sommes servi de l'étuve à vide d'Adnet.



(Fig. 5) — Tubes de Roux pour anaérobiose

CHAPITRE III

Microorganismes cellulophages isolés du *Cossus cossus* Linné

- 1) *Mucor spinosus* Van Tieghem.
 - 2) *Fusarium rubiginosum* Appel et
Wollenweber var. nouv.
-

CHAPITRE III

1) *Mucor spinosus* Van Tieghem

Il nous a été donné d'isoler chez la larve du *Cossus cossus* LINNÉ un *Oomycète* intéressant qui fera l'objet de cette étude. Nous avons obtenu sur les milieux ordinaires utilisés en Mycologie un champignon filamenteux paraissant appartenir aux *Mucorinées*, accompagné d'une bactérie banale sur laquelle nous n'insisterons pas ici. Il ne nous a pas été possible d'isoler le champignon par les méthodes courantes de séparation; nous avons été obligés de faire appel aux procédés d'isolement par lavage décrits dans le chapitre 1^{er} de la première partie de notre travail. L'espèce cryptogamique isolée a été repiquée par nous sur divers milieux, les uns usuels, les autres spéciaux; par l'examen microscopique nous avons constaté sa pureté définitive.

L'étude morphologique a été pratiquée sur des cultures en goutte pendante, sur milieu de RAULIN acide; elle nous a donné les caractères suivants :

Mycélium cloisonné constitué par des filaments incolores et lisses. Ces filaments se ramifient en cymes sympodiaux ou en grappes monopodiales, chaque ramification secondaire donne naissance à une hyphe fructifère qui, à la base, est séparée de l'axe principal par une cloison ne se prolongeant pas sur cet axe, caractère mettant nettement en évidence la famille des *Oomycètes*; les filaments fructifères se renflent souvent près de leur extrémité puis se rétrécissent à la base de la columelle; à l'extrémité supérieure ces hyphes se terminent par un appareil fructifère qui peut prendre deux formes (Planche I (1, 2 et 3) et Fig. 11 : les unes les plus nombreuses sont constituées par des sporanges sphériques, assez volumineux; à l'état jeune ils sont incolores; à la maturité ils prennent une coloration allant du brun foncé au noir opaque. La membrane est finement hérissée de pointes cristallines, disparaissant par l'action des acides dilués; cette membrane se dissout à maturité; la désagrégation commence à la base et à une certaine distance de l'hyphe fructifère, laissant une collerette

qui sépare cette hyphe de la columelle. Celle-ci est incolore, très caractéristique: elle affecte une forme cylindrique ou piriforme; elle est douée d'une grande résistance; munie de protubérances qui l'entourent complètement, mais sont davantage visibles à la partie supérieure; elles sont de taille irrégulière, pointues ou plates, droites ou courbées, souvent noduleuses; leur nombre est très variable; dans beaucoup de cas on rencontre des columelles munies d'une seule protubérance allongée donnant à l'ensemble l'aspect d'un bonnet pointu ou d'un as de pique (Pl. I (4) et Fig. 10). Ce sont ces caractéristiques qui nous ont déterminé à penser que nous avions affaire au *Mucor aspergilloïdes* ZOPF (80) 1881 que nous préférons appeler *Mucor spinosus*, nous rapportant à l'ancienneté des recherches de VAN TIECHEM (70) qui isola cet organisme et le décrivit dans une note parue aux Annales des sciences naturelles en 1876. La deuxième forme d'appareil reproducteur que nous avons pu observer était plus petite; elle avait déjà été vue par VUILLEMIN (72) et désignée par cet auteur sous le terme de sporangiole; dans ce cas la columelle est très réduite, se présentant comme un petit bouton lisse et les sporanges correspondants ne renferment qu'un nombre très réduit de spores, un peu plus grandes que dans la normale.

Les spores normales sont sphériques ou subréunifomes, à membrane lisse et présentant une coloration brunâtre; leurs dimensions varient très peu (Pl. I (5) et Fig. 10 et 11). On trouvera dans le tableau ci-contre les dimensions des différents éléments dont nous venons de parler :

Mycelium : épaisseur de 5 à 12 μ .

Hyphe fructifères : longueur jusqu'à 1 centimètre

largeur à leur extrémité supérieur 3 à 5 μ .

Sporanges : diamètre de 20 à 32 μ .

Sporangioles : diamètre de 12 à 15 μ .

Columelles : longueur de 15 à 25 μ .

largeur de 10 à 15 μ .

Protubérances de la columelle : longueur 2 à 5 μ .

épaisseur 0,4 à 2 μ .

Spores : diamètre de 5 à 9 μ , rarement jusqu'à 10 μ .

Distance, sur les rameaux primaires, de la colerette du sporange jusqu'à l'aisselle du rameau secondaire : de 17 μ à 24 μ .

Optimum de croissance

L'optimum de croissance a été recherché en plaçant plusieurs tubes de liquide de *Raulin* ensemencés en surface au moyen de l'organisme étudié à des températures de + 10°, + 13°, + 16°, + 20°, + 23°, + 25°, + 26°, + 27°, + 28°, + 29°, + 30°, + 36°,

+ 37°, + 39°, + 40°. L'optimum cultural se trouve compris entre + 23° et + 25°. L'organisme pousse encore assez vigoureusement à + 35°, mal à + 37° ; au-dessus de + 38° on ne constate plus guère de végétation. Il cultive faiblement à + 10°.

Caractères morphologiques sur les différents milieux :

Toutes nos cultures ont été effectuées à + 24°, température optima de croissance pour l'organisme envisagé.

A. Milieux liquides :

Milieu de Raulin normal : au bout de 48 heures de culture un début de voile apparaît à la surface du milieu ; après 5 à 6 jours ce voile primitivement blanchâtre est devenu grisâtre ; au fond du tube on peut constater la présence d'un dépôt, lequel examiné au microscope montre des formes levures d'aspect irrégulier et caractérisées par leur mode de bourgeonnement. Celles-ci naissent en grand nombre en des points irrégulièrement distribués à la surface des cellules mères. Alors que chez les jeunes individus le protoplasme est homogène, dans les plus âgés il est granuleux et creusé de quelques vacuoles sphériques et petites ; celles-ci se réunissent plus tard pour constituer une seule vacuole occupant la plus grande partie de la cellule.

Le voile, au début de l'évolution, est constitué d'éléments réguliers que nous venons de décrire. Plus tard il prend un aspect plissé, noirâtre et examiné au microscope nous montre des filaments constitués de nombreux articles courts qui varient de la forme cylindrique à la forme sphérique, à membrane épaissie et constituant des *chlamydospores*. Toutefois ces *chlamydospores* se forment toujours sur les axes principaux et les hyphes fertiles qui peuvent prendre naissance soit du mycélium proprement dit, soit par suite de la germination d'une *chlamydospore*, ne sont jamais très articulés.

Milieu de Raulin glucosé : L'évolution de l'organisme commence à être appréciable au bout de douze heures à la température de + 23° ; la sporulation est accélérée ; le dépôt constitué par des formes levures est quantitativement beaucoup plus important et le bourgeonnement plus actif ; à partir de la deuxième journée on voit des bulles de gaz se dégageant dans le milieu, phénomène qui, après être passé par un maximum, cesse bientôt ; à ce moment le dépôt n'augmente plus sensiblement dans le récipient de culture ; les formes levures prennent une vie ralentie et le protoplasme de ces cellules s'épaissit et jaunit.

Milieu nitraté :

Comme milieu nitraté nous avons employé le suivant :

Eau	1000 cc.
Saccharose	50 gr.
Nitrate de potasse	2 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Chlorure de sodium	1 gr.

La poussée de l'organisme en surface a été très lente et la fructification assez tardive; le mycélium présente de nombreuses chlamydospores; il ne se forme pas de dépôt en profondeur; toutefois le champignon est capable de végéter sur ce milieu.

Milieu ammoniacal :

Le milieu utilisé par nous en vue de l'étude de l'assimilation de l'azote ammoniacal par le champignon a été le suivant :

Eau	1000 cc.
Sulfate d'ammonium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 50
Chlorure de sodium	1 gr.
Saccharose	50 gr.

Sur ce milieu l'organisme a présenté un très bon développement, le voile s'est formé au bout de deux à trois jours et recouvrait toute la surface du récipient de culture; la fructification était perceptible entre 48 et 72 heures et, le cinquième jour, le voile primitivement blanc brillant a pris une coloration gris noirâtre; les filaments mycéliens ne présentent aucune formation de souffrance; les hyphes fructifères atteignent une hauteur d'un demi-centimètre environ; dans le fond du récipient il se forme un dépôt volumineux qui, à l'examen microscopique, montre des spores et des formes levures bourgeonnantes.

Afin d'établir une comparaison entre l'assimilation de l'azote provenant d'un sel nitrique et celle de l'azote tiré d'un sel ammoniacal nous avons dosé l'azote total du mycélium à différentes époques de culture :

Technique du dosage :

Nous inspirant des travaux de TERROINE, WURMSER et MONTANÉ (69) sur le *Sterigmatocystis nigra* et de ceux de BACH (5) sur l'*Aspergillus repens*, il nous a paru nécessaire, pour avoir une donnée exacte

du phénomène, de mesurer à différentes époques de la culture la concentration en ions H du milieu et de plus de doser à ces différents stades l'azote total du mycélium.

La mesure du pH a été effectuée selon la méthode de CLARK et LUBS (16) et à l'aide d'un comparateur; l'azote total du mycélium a été dosé au moyen du procédé de KJELDHAL.

Le tableau suivant exprime les résultats obtenus :

Milieu nitraté :

Age de la culture : ...	0	4	6	8	12	16	20	25	50
pH du milieu	6,6	6,9	6,8	6,1	5,9	5,7	5,3	5,5	6,9
N total p. 100		2,4	4,85	4,8	4,1	3,9	3,5	3	1,4

Milieu ammoniacal :

Age de la culture	0	4	6	8	12	16	20	25	50
pH du milieu	6,6	5,9	6,1	6,2	6,4	6,3	6,1	5,8	6,5
N. total p. 100		3,8	7,5	8,1	7,4	6,9	6,8	6,3	2,5

De ces expériences nous pouvons conclure que, en présence de saccharose comme source de carbone, l'organisme en expérience tire un bien plus grand parti, pour sa constitution plastique cellulaire, de l'azote mis à sa disposition sous forme de sels ammoniacaux que de l'azote qu'il tire des nitrates. Dans le tableau précédent nous avons exprimé les moyennes d'un grand nombre d'expériences. Au cours des premiers jours, sur les milieux nitrates, nous assistons à une diminution de la concentration en ions H; à cette diminution correspond une augmentation de l'azote total fungique mis en évidence; à partir du 6^e jour après l'ensemencement, la concentration en ions H augmente pour s'arrêter à une alcalinisation définitive vers le cinquantième jour de la culture; pendant cette période, l'azote total dosé dans le mycélium diminue constamment. Ces constatations viennent confirmer les travaux de SCHLESSING et MUNTZ (62) d'un côté et de PURIEWITCH (60) de l'autre, qui ont montré que l'assimilation des nitrates chez un grand nombre d'organismes cryptogamiques s'accompagne d'une perte d'énergie considérable due à la transformation des nitrates en nitrites, puis en ammoniacque; ce fait devient apparent dans les premiers jours. Cette assimilation de l'ion nitrique libère donc la base qui lui est unie dans le nitrate et produit une action sur le pH, mais ce phénomène est vite masqué par la production d'acides organiques résultant de la combustion incomplète du sucre; au cours de ces processus d'alcalinisation, MOLLIARD (50) a montré surtout l'importance de la production d'acide oxalique et le rapport de celle-ci avec l'abaissement du quotient respiratoire,

phénomènes qui se manifestent avec d'autant plus d'intensité que le liquide de culture devient plus alcalin; l'augmentation de la quantité d'azote produit dans les premiers jours dépend de la constitution du mycélium qui à l'état jeune est formé uniquement de cellules à protoplasme granuleux; puis intervient un premier processus de protéolyse, comme l'a montré BACH (5) dans ses recherches sur l'*Aspergillus repens*; le mycélium filamenteux, au moment où la courbe des pH remonte, est formé en grande partie de cellules mortes, pauvres en azote et riches en cellulose, tandis que les filaments jeunes en voie de croissance, à protoplasme granuleux sont très rares. Finalement la formation d'acides organiques est ralentie ou supprimée et il intervient une alcalinisation du milieu qui n'est pas due à une manifestation vitale car, par suite de l'épuisement du milieu la nouvelle formation du mycélium n'a plus lieu; par contre la protéolyse se manifeste par une consommation des molécules acides, si bien que la réaction finale va vers l'alcalinité.

En ce qui concerne le milieu ammoniacal et comme on le voit sur le tableau précédent, la concentration en ions H augmente constamment, mais en de très faibles proportions; ceci nous montre que le champignon assimile l'ammoniaque directement, mettant en liberté les ions acides combinés dans le sel mis à sa disposition. Le milieu ne s'alcalinise point, car le champignon consomme pour ses besoins énergétiques des proportions élevées de sucre mis à sa disposition et il en résulte de fortes quantités d'acide oxalique. Dans ces conditions, l'énergie vitale, en vertu de l'équilibre des réactions déterminant une faible acidité presque constante, s'accroît et la protéolyse ne se produit que fort tard par suite de l'épuisement du milieu, amenant alors seulement la diminution de la quantité d'azote totale mise en évidence dans le mycélium par la méthode de KJELDAHL.

B. Milieux solides :

Raulin gélosé neutre :

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le développement de l'organisme commence; le mycélium se présente sur la surface du milieu comme un gazon blanc; il se développe très bien, mais sans donner de fructifications; celles-ci apparaissent très tardivement. Ce milieu ne semble pas très favorable pour la culture de notre organisme.

Milieu de Sabouraud glucosé :

Le mycélium envahit le milieu dans les premières 24 ou 48 heures; le tapis épais se couvre immédiatement d'hyphes fructifères lui don-

nant un aspect gris coeruléux; les hyphes prennent une hauteur remarquable, dépassant même 1 centimètre; l'aspect microscopique de la culture nous montre des filaments robustes à ramifications sympodiales et dont l'axe primaire ne porte aucune cloison sauf dans certains cas, à l'extrémité supérieure, à une faible distance du sporange terminal. Les sporanges sont très volumineux, à parois épaisses et renferment de nombreuses spores, qui, à la mise en liberté, restent agglomérées en amas globuleux caractéristiques.

Milieu de Sabouraud maltosé :

Milieu extrêmement favorable donnant des cultures très luxuriantes. Les caractères microscopiques sont les mêmes que pour le milieu précédent.

Pomme de terre :

Le départ de la culture sur ce milieu est retardé de 1 à 2 jours en comparaison du milieu de SABOURAUD; la fructification est aussi plus tardive, mais ici aussi les hyphes fructifères sont très robustes et très longues.

ETUDE BIOLOGIQUE :

1^o Action sur les hydrates de carbone :

Au cours de ces recherches, nous avons fait usage du milieu liquide ammoniacal dont nous avons donné la formule plus haut, milieu purement minéral auquel nous avons ajouté respectivement les hydrates de carbone suivants :

Saccharose	5 gr.	pour 100
Glucose	3 gr.	—
Maltose	5 gr.	—
Lactose	5 gr.	—
Amidon	2 gr. 50	—

Ayant ainsi 5 milieux contenant chacun son hydrate de carbone respectif, nous avons réparti ces liquides dans des flacons d'ERLENMEYER à raison de 100 cc. par récipient. Tous ces milieux ont été tyndallisés par chauffage à + 60° pendant 1 heure par jour; l'opération a été répétée pendant huit jours.

Nous avons ainsi évité toute interversion ou décomposition de notre milieu ammoniacal.

Les expériences suivantes ont été effectuées :

1^o On a placé un milieu vierge pour chaque hydrate de carbone à l'étuve dans les mêmes conditions que les milieux ensemencés ;

ces tubes ont servi de témoins afin de contrôler la stabilité de nos milieux; en cas de transformation ou d'inversion accidentelle de ceux-ci ils étaient pris en terme de comparaison comme solutions types.

2° Une autre série de récipients semblables contenant 100 cc. de milieu a étéensemencée au moyen de l'organisme en expérience et placée à l'étuve à $+ 23^{\circ}$ dans les mêmes conditions que les récipients non ensemencés.

Toutes ces cultures ont été abandonnées à l'étuve pendant 30 jours, temps auquel nous avons effectué les recherches pour identifier et doser, si besoin était, les monosaccharides ou les produits de dégradation plus simples formés.

Pour la recherche qualitative, nous avons utilisé pour le glucose, les réactifs de FEHLING, de NYLANDER et la méthode des osazones; en ce qui concerne les produits formant avec de l'iode et de la potasse de l'iodoforme nous avons employé la réaction de LIEBEN.

Pour les dosages quantitatifs, nous avons eu recours à la méthode de BERTRAND et à l'examen polarimétrique quant aux monosaccharides.

La recherche quantitative de l'alcool a été effectuée au moyen de l'ébullioscope de MALLIGAUD et chaque dosage a été vérifié par la méthode du compte-gouttes de DUCLAUX.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Dans le milieu à base de saccharose, nous avons pu constater que le champignon était capable d'intervertir ce sucre, ceci toutefois dans de faibles proportions. Nous tenons déjà ici à faire ressortir cette propriété qui nous met en contradiction avec GAYON (22) lequel dans son mémoire sur les fermentations par les *Mucorinées*, n'a pu mettre en évidence cette action fermentative; nous verrons plus loin que dans des conditions particulières ce pouvoir est exalté de beaucoup. Le glucose formé a été décelé au moyen des réactifs appropriés et les dosages, dans une série de 5 milieux, ont donné comme moyenne après 30 jours de culture une assimilation constatée par différence avec les tubes témoins, de 70 centigrammes (saccharose disparu) dosé après interversion totale du sucre contenu dans le milieu; pour nous rendre compte de la qualité de l'hydrolyse, nous avons dosé le glucose formé dans le milieu, non utilisé par le champignon; la moyenne a été de 22 milligrammes.

Maltose :

Dans le milieu contenant du maltose, la recherche du glucose après interversion par hydrolyse artificielle a montré que le champignon a digéré une grande partie du maltose, mais, en essayant de

caractériser les monosaccharides directement dans le milieu sans opérer l'interversion nous n'avons pas pu mettre en évidence des produits de dégradation; il semble donc que l'organisme assimile le maltose directement. La moyenne trouvée au cours des dosages effectués a été de 1 gramme 20 pour 100 cc. de milieu après 30 jours de culture : l'organisme a donc employé cette quantité de maltose pour ses besoins.

Lactose :

En aucun cas nous n'avons pu constater dans nos milieux lactosés une assimilation ou une interversion; ceci est d'ailleurs en rapport avec la médiocrité du développement du champignon sur ce milieu. Le lactose doit être considéré comme un très mauvais aliment.

Amidon :

Nous avons préparé un milieu renfermant 2 grammes 50 d'amidon pour 100 et c'est ce substrat que nous avons examiné après 30 jours de culture; qualitativement nous avons pu mettre en évidence des glucosazones, mais la réduction de la liqueur de FEHLING a été très peu nette.

Le dosage après hydrolyse artificielle nous a montré toutefois en comparaison avec les milieux témoins une assimilation de l'amidon montant en moyenne à 1 gr. 6 pour 100 cc. de milieu; afin de contrôler cette assimilation nous avons traité l'empois par 500 centimètres cubes d'eau; dans cette solution aqueuse nous avons ainsi obtenu les sucres formés par la décomposition de l'amidon. Cette solution sucrée a été ensuite évaporée au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse et le sirop froid traité par 50 centimètres cubes d'alcool à 90° afin de précipiter la dextrine, les sucres restant en solution; après filtration, on dissout la dextrine restée sur le filtre dans 50 centimètres cubes d'eau; on hydrolyse cette solution de dextrine au moyen de 1 centimètre cube d'acide chlorhydrique concentré et on fait le dosage du glucose formé par la méthode de BERTRAND; le liquide aqueux séparé par la filtration est hydrolysé de même et le glucose est dosé; nous avons ainsi trouvé 0 gr. 67 pour 100 centimètres cubes de milieu de dextrine, résidu de l'assimilation fungique; d'autre part, dans la solution aqueuse nous avons par hydrolyse mis en évidence 0 gr. 28 de glucose. Sachant que la fermentation de l'amidon se passe à travers les stades de dextrine et de maltose et d'autre part ayant constaté que l'organisme en expérience assimile le maltose directement sans interversion, il ressort de cette expérience que l'amidon est décomposé par le champignon en maltose, dont il a utilisé pour ses besoins 0 gr. 65; (0 gr. 28 ont été hydrolysés et sont

restés inutilisés) et en dextrine, laquelle est présente dans le milieu à la dose de 0 gr. 67 pour 100 grammes de milieu.

Glucose :

Nous avons utilisé dans ces expériences le milieu ammoniacal que nous employons couramment en y ajoutant 3 grammes pour 100 de glucose. L'organisme se développe au bout de 24 heures formant un voile à la surface du milieu, voile sur lequel au bout de 48 heures la formation des appareils sporifères est constatable par la coloration gris noirâtre; il se forme très vite un dépôt dans la profondeur du vase de culture; après 36 heures déjà nous constatons le début d'une fermentation caractérisée par un dégagement de gaz dans le milieu liquide; cette fermentation s'accroît jusqu'à un maximum. Treize jours après l'ensemencement elle est presque achevée; on ne voit plus que de rares bulles de gaz; vingt-quatre jours après l'ensemencement, la fermentation est terminée. Nous avons déterminé les caractères d'identité au moyen du réactif de LIEBEN et ainsi nous avons pu déceler de l'alcool.

Les dosages ont d'abord été effectués au moyen du compte-gouttes de DUCLAUX en utilisant un milieu vierge comme terme de comparaison, puis au moyen de l'ébullioscope de MALLIGAUD; nous avons ainsi trouvé une moyenne de 97 % de glucose transformé en alcool.

Pour nous rendre compte du pouvoir fermentatif de l'organisme, nous avons mis à sa disposition un milieu contenant 20 grammes de glucose pour 100; cette fois-ci la fermentation s'est arrêtée vers le trente-deuxième jour; nous avons en outre constaté que le glucose n'est pas entièrement fermenté; la méthode de BERTRAND nous a donné la quantité de 7 grammes 75 de glucose non attaqué; le champignon a eu la faculté de vivre dans un milieu renfermant 3,2 % d'alcool que nous avons dosé comme précédemment. Ceci nous prouve que la fermentation alcoolique opérée par l'organisme ne devient nocive pour celui-ci que lorsque la quantité d'alcool formée dans le milieu dépasse 3 %. A part l'alcool nous avons, par la distillation, pu mettre en évidence la présence de traces d'aldéhydes qui donnent à l'alcool une odeur caractéristique et qui sont capables de réduire la liqueur de FEHLING.

Matières quaternaires :

Nous envisagerons ici l'action biologique de l'organisme sur les matières albuminoïdes suivantes : ovalbumine, lactalbumine, peptones.

Ovalbumine :

Dans des tubes de culture, nous avons introduit des cubes d'ovalbumine que nous avons mis en contact avec le milieu suivant :

Eau	1000 cc.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 50
Chlorure de sodium	1 gr.
Glucose	30 gr.

L'organisme se trouvait en présence de matières simples en dehors de l'ovalbumine devant exciter, d'après les travaux de Pasteur (56) l'action diastasique sur le corps envisagé. Après un mois de culture à la température optima de croissance, nous n'avons pu observer microscopiquement aucune attaque de l'ovalbumine, malgré le développement du champignon; le milieu de culture a été ensuite traité au moyen du réactif de TANRET et par la réaction du biuret pour caractériser les albumoses ou les acides aminés ayant pu éventuellement se former par la dégradation de l'ovalbumine; les résultats se sont montrés négatifs. L'organisme ne semble donc pas pouvoir assimiler la molécule protéique très complexe.

Lait

Sur le lait, au bout de 48 heures, l'organisme forme un voile épais à la surface du milieu; le quatrième jour la coagulation est complète; en laissant cultiver le champignon jusqu'au trentième jour, nous n'avons pas observé de dissolution de la caséine. Pour vérifier nos observations nous avons employé des tubes témoins renfermant du même lait pur, dans lesquels nous avons effectué la coagulation artificielle de la caséine au moyen d'acide acétique; le contenu des deux séries de tubes a été filtré à travers des filtres équilibrés d'avance; le coagulum a été lavé à l'eau distillée et séché à l'étuve; les pesées effectuées ensuite n'ont pas donné de différences quantitatives appréciables, de sorte que nous sommes amenés à conclure que le *Mucor* en expérience sécrète une présure, mais ne forme pas de caséase.

Peptones

Pour ces recherches, nous avons utilisé le milieu suivant :

Eau	1000 cc.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 50
Chlorure de sodium	1 gr.
Glucose	30 gr.
Peptone	5 gr.

La culture a évolué très vite donnant au bout de 48 heures, des appareils reproducteurs.

Afin d'examiner la valeur alimentaire de la peptone seule pour le champignon en l'absence de toute matière ternaire nous avons cultivé l'organisme sur le même milieu privé de glucose; dans ce cas nous avons pu constater que la peptone peut couvrir à la fois les besoins en carbone et en azote, mais la marche de la culture est bientôt arrêtée par suite de la dégradation de la peptone et de l'hydrolyse presque complète en ammoniacque. La consommation de la peptone en l'absence de sucre par suite de l'ammoniacque résiduel est une cause d'alcalinisation intense du milieu et à ce stade, le mycélium perd rapidement par protéolyse une forte proportion de son poids, de sorte que nous concluons à la nécessité d'introduire dans les milieux peptonés, pour la culture du *Mucor* en expérience, des produits ternaires. En présence de ces matières qui forment l'aliment énergétique par excellence, l'acte respiratoire et le terme final de la combustion conduisent à une acidification des milieux due à des acides organiques fixes et finalement à l'anhydride carbonique. Ces acides neutralisent largement l'alcalinité produite par l'assimilation peptonique et permettent à l'organisme un développement très luxuriant. La peptone employée en présence de glucose se comporte comme un acide aminé.

Evaluation de l'assimilation de l'Azote de peptones en présence de glucose :

Pour évaluer l'activité du ferment trypsique produit par l'organisme étudié, sur les peptones, matières albuminoïdes solubles et de dégradation avancée, nous avons eu recours à la mesure volumétrique de la quantité d'acides aminés existant dans le milieu à diverses époques de la culture ; ces matières albuminoïdes ont été dosées par la méthode de formoltitration de SÖRENSEN (67).

Afin de pouvoir faire usage de ce procédé, nous avons au préalable dosé les acides libres préexistant dans le milieu de culture vierge à 5 p. 1.000 de peptones, de même que les acides aminés préexistant dans cette solution. En outre nous avons mis en contact 5 ballons renfermant chacun 100 grammes de notre milieu vierge avec du ferment trypsique *Poulenc*, ces ballons ont été placés à la température de $+ 37^{\circ}$ après alcalinisation légère (pH = 8,2) pendant 8 jours. Après cette période, la dégradation de la peptone en acides aminés était complète et la formoltitration nous a donné des chiffres variant de 36 à 40 cc. de NaOH N/10 pour neutraliser les acides aminés formés dans 1000 grammes de

milieu. Après avoir fait ces constatations, nous avons ensemencé 10 ballons renfermant 100 cc. de milieu avec notre *Mucor* ; des dosages ont été effectués sur deux échantillons, le deuxième, le quatrième, le huitième, le quinzième et le trentième jour après l'ensemencement. Le tableau suivant exprime la moyenne des résultats obtenus pour 1000 cc. du milieu :

Acides libres	Acides aminés avant l'action diastase	Acides aminés totaux après culture de					Acides aminés totaux du milieu	Acides aminés disparus après un temps de culture de :				
		48 heures	4 jours	8 jours	15 jours	30 jours		48 heures	4 jours	8 jours	15 jours	30 jours
6,2 cc.	10 cc.	7 cc.	2 cc.	22 cc.	16 cc.	9 cc.	36 à 40 cc.	3 cc.	8 cc.	10 cc. d'ac. am. préexistant 4 cc. d'ac. am. totaux du milieu. 14 cc.	10 cc. d'ac. am. préexistant 10 cc. d'ac. am. totaux du milieu. 20 cc.	10 cc. d'ac. am. préexistant 17 cc. d'ac. am. totaux du milieu. 27 cc.

Nous voyons par ces résultats que le champignon pendant les quatre premiers jours *assimile les acides aminés préexistants dans la solution peptonée* et ne sécrète aucun ferment tryptique ; c'est seulement au moment de l'épuisement de l'aliment azoté directement assimilable *qu'il se résout à produire un ferment tryptique qui est d'une activité très prononcée, puisque le huitième jour le ferment semble avoir dégradé toutes les matières albuminoïdes présentes dans le milieu*. La montée brusque de la courbe des acides aminés existant après 8 jours de culture prouve ce fait, car la totalité de ces acides aminés produits par 5 grammes de peptones étaient représentée par 36 à 40 cmc. de soude N/10 ; par conséquent le chiffre 22 trouvé le 8^e jour représente la totalité des acides aminés diminuée de 10 exprimant les acides aminés préexistants, + 4 à 8 pour les acides aminés nouvellement formés par l'hydrolyse totale ; le champignon a donc, au cours de ces 8 jours de culture, utilisé 10 + 4 à 8 d'acides aminés pour former de l'albumine fungique.

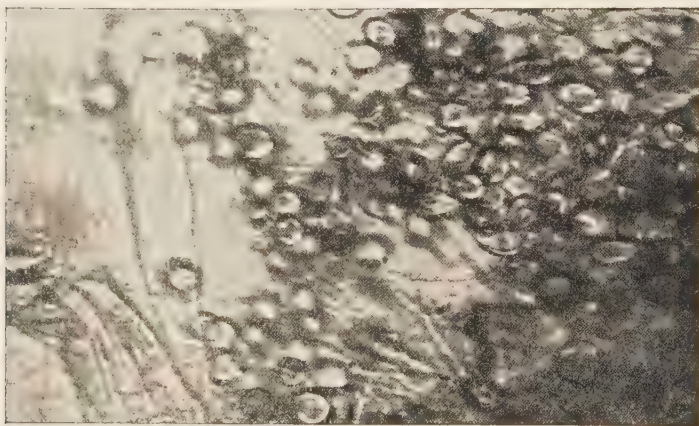
Action assimilatrice du Mucor spinosus vis-à-vis de la cellulose

Etant donné les conditions de vie du *Mucor spinosus* à l'intérieur du tube digestif des larves xylophages il nous a paru nécessaire d'examiner les caractères morphologiques, les conditions de croissance et les propriétés biologiques de l'espèce sur les milieux spéciaux à base de cellulose, afin de rechercher un terme de comparaison entre cette assimilation et l'assimilation des autres hydrates de carbone par cet organisme.

Nous avons composé à cet effet le milieu suivant :

Eau de robinet	1000 gr.
Chlorure d'ammonium.....	0 gr. 5
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Nitrate d'ammoniaque	0 gr. 5
Phosphate monopotassique	0 gr. 2
Cellulose pure Poulenc râpée	10 gr.

L'organisme ensemencé sur ce milieu pousse sous la forme d'une croûte de couleur crème, la récolte est très faible. Le milieu a pris une consistance pâteuse et une teinte jaune orangée. L'examen microscopique nous montre des éléments ovales ou ronds à parois extrêmement épaissies formant une sorte de coque dure et jaunâtre



(Fig. 6)

autour d'une région centrale très réduite et renfermant le protoplasme ((Fig. 6), Pl. I, Fig. 9). Dans certains cas la cellule présente une sorte de pore germinatif par lequel sort un prolongement à l'extérieur.

Dimensions des éléments

Cellules-mères à coque	16 à 20 μ	de diamètre
Coques seules	3,7 à 6 μ	—
Epaisseur du canal	2 à 5 μ	—
Longueur des prolongements ..	25 à 30 μ	—

Ces formes réensemencées sur pomme de terre donnent en germant un mycélium filamenteux produisant des hyphes fructifères du type normal du *Mucor spinosus*. Nous avons donc affaire à une forme d'adaptation de l'organisme sur milieu cellulose, pauvre en matières nutritives.

Les dosages pondéraux de la cellulose primitive et de celle restant après 30 jours de culture nous ont montré que l'organisme avait assimilé 3,8 % de cet hydrate de carbone.

Considérant la faible vitalité de l'organisme dans ces conditions de culture, il nous a semblé bon de les modifier et de réaliser des milieux s'adaptant mieux à sa vie normale. Dans cet ordre d'idées, nous avons eu recours aux expériences de Madame KHOUVINE-DELAUNAY (36) et nous avons composé le milieu suivant :

Eau de source	850 cc.
Extrait de matières fécales	250 cc.
Chlorure d'ammonium.....	1 gr.
Chlorure de sodium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Cellulose pure	10 gr.

La croissance du champignon est très luxuriante et les caractères morphologiques sont identiques à ceux observés sur milieux de RAULIN. En ce qui concerne l'assimilation de la cellulose, nous avons par dosage pondéral constaté que le champignon employait pour ses besoins vitaux une quantité de cellulose inférieure (2,6 %) à celle trouvée dans l'expérience précédente. Nous voyons donc que l'apport de matières fécales favorise la croissance du Mucor, mais diminue de beaucoup son action assimilatrice vis-à-vis de la cellulose.

Après ces recherches nous résolûmes, pour nous rapprocher encore davantage des conditions existant dans le tube digestif des insectes, d'effectuer des expériences dans une atmosphère pauvre en oxygène. A cet effet, nous avons effectué des cultures en *milieu anaérobie* ; et les résultats ont été comparés à des cultures témoins en *aérobie*.

En *anaérobie* nous avons pu constater microscopiquement un mycélium composé de filaments grêles, incolores, lisses, à parois épaissies. Les hyphes fructifères présentent des ramifications qui se séparent par une cloison au-dessus de l'aisselle du rameau secondaire. En outre, il se forme toujours une cloison à la base de la columelle. Les spores sont normales et peuvent germer.

Les recherches quantitatives au sujet de l'assimilation cellulosique dans la vie anaérobie nous ont donné de 4,3 à 6 % de cellulose, disparue au cours de 20 jours. Ces expériences montrent que l'anaérobiose est un facteur exaltant l'apparition de diastases hydrolysantes pour la cellulose.

Afin de constater les produits ternaires issus de la dégradation cellulosique nous avons effectué sur une culture de 18 jours la plas-

molyse, en ajoutant une solution concentrée de phosphate trisodique dans notre milieu; le tout a été placé à $+ 37^{\circ}$ pendant 4 heures. Nous avons filtré, et en employant notre filtrat issu de l'action plasmolytique, nous avons dosé dans deux échantillons identiques le glucose : dans l'un sans hydrolyse préalable, dans l'autre par l'intervention artificielle à l'aide de l'acide chlorhydrique; nous avons pu constater que dans le deuxième cas la quantité de glucose présente était augmentée; il devait par conséquent se trouver dans le filtrat en outre de glucose un disaccharide. Nous avons essayé de caractériser celui-ci.

Nous avons vu par les expériences de VAN ITERSON (35) que les produits d'expression de mycélium de champignons cellulophages qui sont de vrais destructeurs de bois ne renferment aucun ferment hydrolysant la cellulose. Mais cet auteur, en tuant des champignons ayant poussé sur du papier par agitation en présence de xylol, fit remarquer que les produits d'expression du mycélium opéraient la réduction de la liqueur de FEHLING en présence de sucres non réducteurs; PRINGSHEIM (59), rapporte le fait suivant : les antiseptiques sont capables d'arrêter des fermentations se manifestant par de fortes productions gazeuses. D'autre part, les ferments hydrolysants agissent malgré la présence d'antiseptiques, comme le prouve un grand nombre d'expériences d'hydrolyse en contact avec le xylol et le chloroforme, etc. La combinaison de ces deux expériences peut permettre d'inhiber la fermentation sur les produits d'hydrolyse, c'est-à-dire d'amener l'accumulation des produits d'hydrolyse dans le milieu et la séparation des divers ferments d'un organisme. Nous avons utilisé dans ce but comme antiseptique le xylol pour deux raisons : 1^o il est entraînable par la vapeur d'eau, et ainsi facilement éliminable; 2^o il ne possède aucune propriété réductrice sur la liqueur de FEHLING.

Nous avonsensemencé 1 litre de notre milieu au moyen de l'organisme en expérience, la culture a été placée à $+ 27^{\circ}$ pendant 20 jours, puis nous avons ajouté 50 grammes de xylol et agité pendant 15 minutes; on a ensuite replacé la culture bien fermée à l'étuve pendant 10 jours; on a filtré et le filtrat a été évaporé jusqu'à 105 cc. dans le vide. L'extrait obtenu est précipité par l'alcool à 95° et évaporé à sec; le résidu est repris par 30 cc. d'eau; les composés nitreux sont éliminés par l'action de l'acide acétique en présence d'urée et la réaction des ozones est effectuée : 1 gramme d'acétate de soude + 0,5 de chlorhydrate de phenylhydrazine + 30 cc. de notre solution sont chauffés au B. M. pendant 1 heure $\frac{1}{2}$. Après filtration nous lavons à l'eau le précipité produit et nous le reprenons pour le faire cristalliser par de l'alcool à 50 %; nous obtenons des cristaux qui sont caractérisés : 1^o microscopiquement,

2° par le point de fusion et 3° par le pouvoir rotatoire connu des glucosazones.

Recherche de la cellobiose

Une culture effectuée sur 5 litres de milieu cellulosique est plasmolysée après 30 jours. On y ajoute 250 cc. de xylol ; huit jours après, la solution réduit la liqueur de FEHLING ; on sépare la solution du mycélium par filtration et le filtrat est évaporé à 100 cc. dans le vide. Il est précipité par l'alcool absolu et soumis à des lavages prolongés à l'alcool ; la solution alcoolique est évaporée à sec et le résidu repris par 250 cc. d'eau et on y ajoute 2 grammes de levure de bière. Le tout est placé stérilement à l'étuve à + 30° pendant 5 jours ; le glucose a ainsi été éliminé de notre milieu par transformation en alcool et formulé CO^2 . Après filtration du liquide, l'alcool formé a été chassé par évaporation et le résidu est repris par 50 cc. d'eau.

Nous avons poussé la concentration jusqu'à obtenir un liquide sirupeux presque incolore auquel nous ajoutons de l'alcool absolu et de l'éther en parties égales jusqu'à ce qu'il se forme un trouble. Après plusieurs heures de repos on obtient un précipité cristallin, on filtre et on dissout les cristaux qui restent sur le filtre au moyen d'eau chaude ; après une nouvelle concentration jusqu'à consistance sirupeuse, et une nouvelle précipitation par l'alcool absolu on obtient une poudre blanche en petite quantité qui a été caractérisée comme du cellobiose par les réactions suivantes :

I. Action réductrice de la liqueur de Fehling :

0 gr. 1 de notre produit a réduit 14,97 cc. de liqueur de FEHLING.

II. Pouvoir rotatoire :

A 18°, en solution à 10 % le pouvoir rotatoire stable après 15 heures a été de : + 33°, 46.

III. Osazones :

L'osazone a été préparée suivant la méthode exposée précédemment à propos de la glucosazone : on obtient après chauffage au B-M un liquide sirupeux qui, par addition d'eau, précipite l'osazone en cristaux d'une coloration jaune. On purifie par recristallisation après dissolution dans l'alcool à 50 % ; ces cristaux ont un point de fusion situé entre + 197°, 2 et + 197°, 9. Ces réactions et ces résultats correspondent aux chiffres et aux caractères donnés pour le cellobiose et, dans le tableau suivant, on pourra comparer nos résultats avec ceux indiqués pour le cellobiose par SKRAUP (66) et FISCHER et MAQUENNE (19, 46).

	Résultat obtenu :	Cellobiose :
Pouvoir rotatoire	+ 33°,46	+ 33°,8 à 34°
Pouvoir réducteur	pour 1 gr. : 149,7	pour 1 gr. : 153,1
Point de fusion de l'osazone.....	197,2 à 197,9	198

Afin de déterminer aussi rigoureusement que possible ces caractères nous avons répété plusieurs fois ces recherches, vu les quantités très faibles (0 gr. 3 à 0 gr. 6) de produit pur obtenu.

D'autre part, afin d'apporter une preuve de plus dans cette voie, nous avons eu recours aux travaux de FISCHER et ZEMPLEN (19) d'un côté et de BERTRAND et HOLDERER (9) de l'autre. En effet, ces auteurs ont noté que le cellobiose à l'inverse du maltose était décomposé en deux molécules de glucose par l'action de l'émulsine du commerce, tandis que la levure était sans action sur ce sucre.

Pour cette raison nous avons effectué pour l'identification de la cellobiose au moyen de l'émulsine, les recherches d'hydrolyse suivantes : On a opéré également sur 5 litres de milieu cellulosique et suivant la même technique que précédemment. Le glucose a encore été éliminé par l'action de la levure et la solution concentrée par la chaleur jusqu'à 60 cc.; 10 cc. de cette solution ont été mis en présence de xylol et le tout a été placé à + 37° pendant 5 jours. Après cette période nous avons ajouté les réactifs nécessaires pour la production des osazones et le tout a été chauffé au bain-marie pendant 1 heure $\frac{1}{2}$. Au cours de cette manipulation nous n'avons pu mettre en évidence aucun osazone, presque tout le glucose avait été éliminé de notre milieu par l'action de la levure. Les 50 cc. restant ont été mis en présence de 2 grammes d'émulsine dans les mêmes conditions que les 10 cc. employés précédemment; après 5 jours de contact à l'étuve à + 37°, on a pratiqué la réaction des osazones, en employant 2 grammes d'acétate de soude et 1 gramme de chlorhydrate de phénylhydrazine, on a chauffé pendant 3 heures au B.-M. et le liquide concentré a été dilué au moyen d'eau; en se refroidissant la solution laisse cristalliser des osazones. Celles-ci ont été lavées avec de l'eau pour enlever les traces de cellobiosazone qui pouvaient encore exister; le maximum des cristaux ne se dissout pas et après recristallisation par de l'alcool à 50 % nous obtenons le glucozazone qui est identifié par ses propriétés physiques.

Ceci nous démontre que nous étions en présence de cellobiose qui a été, par l'action de l'émulsine, dédoublé en deux molécules de glucose. Nous voyons donc que l'assimilation de la cellulose par le *Mucor spinosus* exige une dégradation passant à travers les stades de cellobiose et de glucose. C'est donc ces saccharides

simples que l'organisme utilise pour ses besoins énergétiques, en décomposant la cellulose qui lui est fournie comme matière nutritive dans un milieu minéral — matières fécales renfermant de l'azote sous forme de sel ammoniacal et en anaérobiose.

Nous rappelant de l'expérience effectuée sur milieux glucosés dans lesquels nous avons pu mettre en évidence une fermentation alcoolique, nous avons jugé utile de reprendre la même expérience avec un milieu cellulosique en abandonnant la culture à l'anaérobiose à $+ 23^{\circ}$ pendant quarante jours. Au bout de ce temps nous avons effectué la recherche de l'alcool au moyen de la réaction de LIEBEN. Celle-ci a encore été positive; d'autre part nous avons pu mettre en évidence par le réactif d'UFFELMANN, dans notre milieu la présence de traces d'acide lactique.

Par la mise en évidence de ces produits nous pourrions conclure que la fermentation cellulosique produite par le *Mucor spinosus* en anaérobiose est bien différente de la fermentation bactérienne connue, des expériences de PRINGSHEIM (59) et d'OMELIANSKI (54). Nous avons constaté que cette fermentation passe à travers le stade hydrate de carbone facilement assimilable pour aboutir finalement à la production d'alcool et d'anhydride carbonique.

Vu l'augmentation de la production des ferments, augmentation constatée dans la vie anaérobiose, on a effectué des cultures sur différents milieux renfermant d'autres hydrates de carbone et nous avons ainsi pu comparer l'action assimilatrice et hydrolysante de notre champignon en aérobiose et en anaérobiose; les résultats trouvés avec les différents hydrates de carbone sont exprimés en milligrammes dans le tableau suivant :

		Aérobiose		Anaérobiose	
		Assimil.	Hydrol.	Assimil.	Hydrol.
Milieu initial	+ Maltose	12	0	27,5	5,3
—	+ Lactose	0	0	0	0
—	+ Saccharose	7	2	22,3	14,1
—	+ Amidon	18,8	0	31,6	6,2
—	+ Cellulose	2,6	0	4,3	0,7

En résumé l'anaérobiose fait apparaître des diastases hydrolysantes en ce qui concerne le maltose et l'amidon ainsi qu'une dégradation beaucoup plus prononcée de la cellulose ; elle exalte les propriétés hydrolysantes vis-à-vis du saccharose.

Etude de l'action du Radium sur le Mucor spinosus

Sous l'influence des travaux que nous avons nous-même mis en œuvre lors de nos recherches sur les modifications morpholo-

giques et biologiques de l'*Aspergillus fumigatus* Fres. par l'action du Radium et des recherches de NADSON et PHILIPPOV (53) sur l'influence des rayons X sur la sexualité chez les Mucorinées, nous avons été amenés à exposer notre organisme au Radium. Dans ces essais nous nous sommes une fois de plus servi des données de GREDEL et de SCHNEIDER (26) en ce qui concerne la composition des milieux de culture. On a employé une solution fondamentale dont la composition a été la suivante :

Saccharose pur	5 gr.
Gélatine isoélectrique	7 gr. 5
Jus de carotte	Q. S. pour 100 cc.

Ce milieu a été additionné d'un électrolyte différent pour chaque essai; le milieu a toujours été amené au pH = 6,6 concentration optima en ions H pour l'organisme envisagé. Les électrolytes employés ont été le chlorure de sodium, le bromure de potassium, le sulfate de thorium, le chlorure de magnésium. On a pratiqué l'ensemencement de ces milieux répartis dans des tubes de Borrel et les cultures ont été placées à + 18°. La concentration en électrolyte était, pour le sulfate de thorium de 1/10.000; pour le bromure de potassium de 0,5 %; pour le chlorure de sodium de 1 %. Les cultures ont été exposées le cinquième jour après l'ensemencement à l'action du radium; la technique employée pour l'irradiation a nécessité l'exposition dans différentes conditions : 1° Les tubes de radium sont en contact direct avec le mycélium du champignon; 2° les tubes de radium sont placés à une distance de 1 centimètre de la surface du mycélium; 3° ceux-ci sont à une distance de 8 centimètres de la surface. Les doses employées ont été de 2,5; 5,5 et 12 millicuries par centimètre carré de surface.

Dans ces expériences, nous avons fait les observations suivantes :

Milieu au thorium

L'irradiation au moyen de 12 millicuries dans les deux premiers cas (contact direct et distance de 5 mm.) a nettement entravé la croissance. Le milieu s'est liquéfié après 8 à 10 heures et après une période latente de 3 à 5 jours; le mycélium a évolué vers des formes sphériques à membrane épaissie; ces éléments sont tombés dans la profondeur du tube de culture et le cinquième jour après l'irradiation nous avons assisté à une fermentation gazeuse du milieu dans lequel nous avons, entre le 25^e et le 30^e jour après l'ensemencement, pu doser jusqu'à 10 % d'alcool en considération du saccharose présent dans le milieu.

Sous l'influence de la dose de 2,5 millicuries par centimètre carré à une distance de 8 centimètres, nous avons observé une stimulation incontestable du développement du *Mucor spinosus*. Cette excitation dans la croissance s'est surtout manifestée pour la partie végétative du champignon; par contre le nombre des sporanges a été plutôt réduit, mais leurs caractères morphologiques n'ont pas été modifiés.

Milieux au bromure de potassium et au chlorure de magnésium

Avec des doses massives d'irradiation mentionnées plus haut nous avons assisté également à la liquéfaction du milieu et à la formation de chlamydospores; la forme mycélienne n'a toutefois pas été supprimée; les appareils reproducteurs asexués sont plus petits et présentent sur leurs contours de nombreuses incrustations, des spicules qui disparaissent par l'addition d'acides; la fermentation s'est produite mais n'a pas été aussi importante que dans le cas du milieu au *Thorium*. Les doses moyennes et faibles n'ont pas apporté de modifications sensibles dans l'évolution de l'organisme, sauf en ce qui concerne la coloration du tapis formé par les hyphes fructifères qui a passé du noir violet au gris.

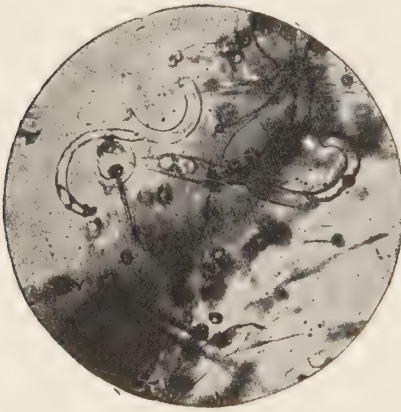
Milieux au chlorure de sodium

Le milieu au chlorure de sodium à une concentration de 1 % nous a donné des résultats qui nous paraissent des plus intéressants : avec une dose massive de radium et à une distance très faible du mycélium, nous avons obtenu une réduction très prononcée dans la formation de nouveaux sporanges; l'appareil végétatif n'a pas subi la dégradation en formes levures; les filaments mycéliens ont une dimension plus épaisse; ils présentent des cloisons nombreuses, très rapprochées les unes des autres, et la coloration par le triple colorant de GUEGUEN révèle un protoplasme très granuleux et l'absence presque complète de graisses. Les sporanges préexistants avant l'irradiation n'ont pas été modifiés et des ensemencements effectués au moyen de spores de cette origine ont produit des cultures normales.

Par une irradiation de 2,5 millicuries à une distance de 5 millimètres de la surface du mycélium, nous avons constaté une tendance des filaments à s'enrouler sur eux-mêmes (fig. 7), phénomène qui atteignait aussi les hyphes sporangifères, de sorte que celles-ci prennent une forme présentant une certaine analogie avec celle observée sur *Mucor circinelloïdes*. Dans ce cas nous avons souvent vu que certains sporanges ne continuent pas leur développement; la paroi s'épaissit et nous assistons à la formation d'une sorte de

chlamydospore; la membrane ne devient pas déliquescente; elle prend un double contour; le protoplasme non segmenté accumule une grande réserve en matières grasses: les dimensions de cette sorte de chlamydospore rappelant celle de *Mucor circinelloides* obtenue dans des conditions normales et décrite par VUILLEMIN (72) restent plus petites que celles des sporanges définitifs et les hyphes qui les supportent sont très frêles, allongées et prennent un aspect très réfringent. Dans ces conditions, la végétation du mycélium est plus luxuriante que dans la normale; partout nous rencontrons cette tendance à l'enroulement, à l'allongement des filaments renfermant un protoplasme paraissant fluidifié et non granuleux.

C'est enfin par une irradiation de 5,5 millicuries par centimètre carré, à une distance de 8 centimètres de la surface que nous avons obtenu sur le milieu renfermant le chlorure de sodium à la concentration de 1 %, et, avec une culture qui était exposée le cinquième jour après l'ensemencement, l'apparition de zygospores. Le processus a été le suivant :



(Fig. 7)

Mucor spinosus: influence du Radium, formes en cresses.

Vingt-quatre heures après le début de l'irradiation, la liquéfaction du milieu a commencé; après une période latente de cinq à six jours un dégagement gazeux assez notable s'est produit et la pigmentation du voile mycélien

est devenue plus foncée jusqu'à paraître nettement noire. L'examen microscopique pratiqué sur des prélèvements effectués dans la partie immergée de la culture nous montre des filaments à condensation protoplasmique; la coloration par le triple colorant de Gueguen et par l'acide osmique nous prouve l'absence de graisses; les hyphes ont aussi ici évolué en forme de cresses; la coloration accentuée est due à la présence abondante de chlamydospores à parois très renforcées, les rares sporanges persistant dans le milieu ont subi un gonflement exagéré (35μ à 40μ); les membranes de ceux-ci sont hyalines et le contenu protoplasmique fractionné est accumulé au centre autour d'une columelle très petite.

Cinq jours après l'irradiation, nous observons une accentuation dans le contournement des filaments et une attraction réciproque des rameaux voisins qui prennent la forme massue; une cloison se forme, séparant à l'extrémité une cellule qui deviendra un gamète

futur. L'évolution de ce phénomène a été suivie sous le microscope et, le cas échéant, nous avons employé des colorations vitales pratiquées au moyen de solutions à 0,05 % de *violet de dahlia* et de *vert malachite* (W. ALBACH) (2). Les gamètes observés étaient inégaux et leur rapprochement par attraction réciproque ne s'est que rarement manifesté dans une direction rectiligne; au contraire, dans la majorité des cas un des gamètes était dévié en arrivant à proximité de l'autre pour atteindre celui-ci latéralement (Fig. 8a et 8b). Les gamètes ne tardent pas à se souder; la cloison mitoyenne se résorbe; avant ce phénomène nous assistons à une concentration protoplasmique dans chaque suspenseur qui émigre vers les extrémités et subit un fractionnement répété. Mais ce phénomène ne se produit pas simultanément dans les deux gamètes et l'un de avance de 10 minutes environ l'autre. Il semble donc que le protoplasme renferme plusieurs noyaux autour desquels se produisent les concentrations protoplasmiques, mais la densité du protoplasme d'un côté et la difficulté d'effectuer des colorations vitales nucléaires de l'autre ne nous permettent pas de mettre nettement en évidence les noyaux. Aussitôt que le fractionnement a atteint sa limite dans les deux gamètes, la cloison mitoyenne s'est résorbée rapidement et nous assistons à la formation d'une jeune zygosporé à parois minces et lisses; les différentes masses protoplasmiques se fusionnent et augmentent bientôt leur condensation. Nous l'avons pu suivre microscopiquement jusqu'à ce stade. Dans la culture irradiée, le huitième jour après l'irradiation, la présence de nombreuses zygosporés nous a montré que le phénomène sexué était réalisé; les zygosporés (fig. 9) sont sphériques, entourées d'une exospore ovoïde surchargée de petites plaques cristallines; un épaissement de la membrane se produit au moyen de couches cellulosiques et par des accroissements irrégulièrement disposés; il se



(Fig. 8a) — Formation des gamètes chez le *Mucor spinosus* sous l'influence du Radium.

forme des excroissances verruqueuses qui, avant la maturité, ont une coloration brun violacé; finalement cette membrane s'éclaircit pour devenir hyaline et se désagrège à ce stade. Nous voyons donc que la formation de la zygospore se fait par hétérogamie; nous avons même eu l'occasion d'observer des zygospores qui se formaient sur un gamète, l'autre restant éphémère, procédant par un phénomène s'arrêtant au stade de l'attraction et n'arrivant pas à la fusion.

N'ayant jamais, au cours de nos recherches, pu observer la formation de zygospores sur les milieux usuels utilisés en Mycologie, il nous a semblé intéressant de recourir à la technique de BAINIER (7) en cultivant notre organisme sur un milieu constitué par une décoction alcoolique de poires et de prunes.

Nous n'avons pu réaliser, par cette technique, l'apparition du phénomène sexué; nous avons ensuite, nous inspirant de la théorie de BLAKESLEE (12) ensemencé sur le même milieu un sporange de notre souche et un autre d'une souche mise à notre disposition par le Laboratoire de BAARN (Hollande). Nous avons ainsi essayé d'obtenir des zygospores par hétérothallie, mais ces expériences sont restées infructueuses.

Il nous semble toutefois intéressant d'insister ici sur la propriété du *Mucor spinosus* de produire une fermentation alcoolique, fermentation qui devient très intense en anaérobiose; les cultures exposées dans ces conditions, donc en présence d'alcool et en l'absence d'oxygène, ne nous ont jamais donné la reproduction sexuée. D'un autre côté, BAINIER a réussi à obtenir cette reproduction dans la profondeur du milieu en présence d'alcool, condition qui ne nous semble pas nécessaire puisque, en présence d'hydrates de carbone, l'organisme est capable à lui seul, comme l'a montré avant nous Gayon, de produire une fermentation alcoolique. Il se peut cependant que l'excitation occasionnée par le radium sur la production d'alcool



(Fig. 8b) — *Mucor spinosus*.
Rencontre de 2 gamètes.

soit une condition favorable à l'apparition du phénomène, mais l'anaérobiose est plutôt inhibitrice; la condition nécessaire semble donc être un appauvrissement en oxygène et non une anaérobiose stricte.

CONCLUSION

I. Caractères morphologiques

Le champignon isolé par nous, examiné en goutte pendante dans le milieu de RAULIN après repiquages successifs qui nous ont permis de fixer l'espèce, a présenté les caractères morphologiques correspondant aux données de RABENHORST, ZOPF, VAN THIEGHEM, GAYON, BAINIER et VUILLEMIN en ce qui concerne le *Mucor spinosus* quant aux appareils végétatifs et reproducteur asexué.

II. Caractères biologiques :

a) *Vie aérobie* : Sur les milieux usuels employés en mycologie l'organisme se développe d'une façon satisfaisante. L'optimum cultural de température est situé entre $+ 23^{\circ}$ et $+ 25^{\circ}$. La concentration en ions H la plus favorable pour le maximum de récolte correspond à $\text{pH} = 6,6$.

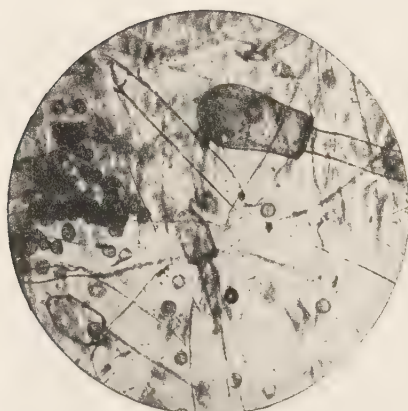
b) *Action sur les Hydrates de carbone* : Le champignon ensemencé sur un milieu synthétique composé uniquement

de sels minéraux bien définis et en présence d'azote ammoniacal assimile le glucose directement ainsi que le maltose; le saccharose est interverti et l'organisme utilise le glucose en résultant. Le lactose et la dextrine sont des aliments très médiocres et négligés. L'amidon est hydrolysé en maltose et dextrine et le champignon utilise le maltose mis en liberté. En outre le *Mucor spinosus* peut utiliser jusqu'à une proportion de 3 % d'alcool pour ses besoins énergétiques.

c) *Action sur la cellulose* : Le champignon cultivé sur un milieu minéral bien défini et comprenant comme source d'azote un sel



(Fig. 9) — *Mucor spinosus*: Zygospores.



(Fig. 10) — *Mucor spinosus*:
Aspect de différentes columelles.

extrêmement favorables et permettent à l'organisme de végéter même en l'absence d'hydrates de carbone, mais la dégradation de la peptone mettant en liberté une forte proportion d'ammoniaque entrave bientôt la croissance de l'organisme; les hydrates de carbone sont donc nécessaires, car ils forment des acides organiques fixes qui conduisent à une acidification du milieu permettant un développement très luxuriant; la peptone employée en présence d'hydrates de carbone se comporte comme un acide aminé simple.

Le champignon végète mal et prend une allure chétive sur milieu saccharosé en présence d'azote fourni par un sel nitrique; au contraire sur milieu saccharosé l'organisme tire un très bon parti pour sa constitution plastique cellulaire de l'azote mis à sa disposition sous forme de sels ammoniacaux.

IV. Vie anaérobie :

L'organisme, ensemencé sur milieu synthétique composé de

ammoniacal et une petite quantité d'extrait de matières fécales, assimile la cellulose dans des proportions qui ne sont pas négligeables, en la transformant au préalable en *Cellobiose* et en *Glucose*.

d) *Action sur les matières azotées* : Le *Mucor spinosus* n'attaque pas la molécule protéique très complexe telle que l'ovalbumine; il sécrète une présure occasionnant la coagulation du lait, mais n'est pas capable d'utiliser la caséine.

Les peptones sont des aliments



(Fig. 11) — *Mucor spinosus*:
Sporanges, sporangioles et spores.

sels minéraux bien définis et en présence d'azote ammoniacal fourni par un sel et une petite quantité d'extrait de matières fécales, assimile beaucoup plus le maltose en vie anaérobie; de plus il en hydrolyse une quantité appréciable, fait que nous n'avons pas constaté dans les cultures exposées à l'air.

En ce qui concerne le lactose, il se comporte de la même façon qu'en aérobie.

Pour le saccharose, nous constatons en anaérobie une augmentation notable dans l'hydrolyse et dans l'assimilation.

L'assimilation de l'amidon par le *Mucor spinosus* est augmentée et nous assistons à une hydrolyse de ce produit.

En ce qui concerne la cellulose, l'anaérobie exhorte de beaucoup l'assimilation par le *Mucor spinosus* et les propriétés hydrolysantes vis à vis de cet hydrate de carbone. L'assimilation de la cellulose par notre organisme exige une dégradation passant à travers les stades de cellobiose et de glucose. Ces saccharides simples sont utilisés par l'organisme pour ses besoins énergétiques.

V. Action du radium :

a) Sur les milieux usuels de laboratoire et suivant la technique de BAINIER d'un côté, de BLAKESLEE de l'autre, nous n'avons jamais obtenu le phénomène sexué.

b) L'irradiation à une dose de 5,5 millicuries par centimètre carré de surface, à une distance de 8 millimètres de la culture a occasionné le phénomène sexué seulement dans le milieu spécifique : jus de carotte gélatiné dissocié par le chlorure de sodium. Nous constatons ici les mêmes faits que lors de nos expériences antérieures concernant l'action du radium sur les champignons inférieurs : *période latente* (5 à 8 jours après l'irradiation), *spécificité du milieu*, *liquéfaction* de celui-ci et *augmentation de la concentration en ions H*, première conséquence de l'action du radium.

c) L'organisme en expérience présente les caractères suivants : filaments mycéliens incolores et lisses à hyphes fructifères ramifiées en cymes sympodiaux se terminant toujours par un sporange; sur le rambeau se forme une cloison au-dessus de l'aisselle du rameau secondaire. Sporangies de deux sortes : les uns grands; les autres plus petits nommés par VUILLEMIN sporangioles; columelles cylindriques ou piriformes avec colerette et protubérances. Spores rondes ou subréunifomes colorées en brun et mesurant de 5 à 7 μ sur 3 à 4 μ . Zygosporos ovoïdes à suspenseurs inégaux mesurant 40 à 50 μ sur 50 à 60 μ ; épaisseur de l'exospore : 5 μ , 2 à 7 μ . Longueur des gamètes : environ 16 à 25 μ ; largeur : les uns 8 à 10 μ , les autres 5 à 7 μ . Présences d'azygosporos.

2) *Fusarium rubiginosum* APPEL et WOLLENWEBER.

Nous décrivons à présent un autre organisme isolé, lui aussi de l'intestin de larves de *Cossus cossus* LINNÉ. Les méthodes de séparation ont été appliquées pour obtenir une culture pure; puis des repiquages ont été effectués durant un an sur divers milieux végétaux tels que pommes de terre, carottes, tiges de pomme de terre, tiges de haricots, bananes de façon à fixer le mieux possible notre organisme. A ce moment nous avons employé des cultures en cellule qui ont été pratiquées sur le milieu minéral employé dans l'étude du *Mucor spinosus*, où nous avons substitué à l'aliment azoté minéral la peptone, à raison de 10 grammes pour 1000; de plus nous avons remplacé le saccharose par le maltose: l'organisme pousse rapidement; il nous donne les caractères morphologiques suivants: Mycelium formé de cellules cylindriques, cloisonné, ramifié d'une façon assez irrégulière; de nombreuses anastomoses entre filaments voisins sont visibles; dans certains cas les filaments sont susceptibles de se juxtaposer parallèlement pour donner une sorte de cordon. Le protoplasme est hyalin, entouré d'une membrane mince et lisse; certains rameaux qui donneront des conidies sont insérés latéralement sur les filaments primaires (Pl. II, fig. 10) sur ces rameaux se forme près de l'extrémité terminale une ébauche de renflement; celle-ci grandit et nous n'observons pas de cloisonnement nouveau; quand la longueur du rameau atteint environ 5 μ , nous assistons à la formation d'un petit étranglement à l'extrémité. Celui-ci grandit alors et donne naissance à une spore en forme de lentille biconvexe, incolore; quand cette spore s'est séparée du rameau, il s'en forme d'autres successivement; dans l'air humide tous ces éléments restent agglutinés en forme de boule à l'extrémité (Pl. II, fig. 11). Les rameaux que nous venons de décrire sont insérés en verticilles réguliers, à différentes hauteurs du filament primaire. L'agglutination des spores entre elles est produite par une sorte de gélification de la membrane, très intense dans la partie périphérique; ce phénomène devient très apparent quand le milieu commence à se dessécher. Ayant replacé ces spores dans une goutte d'eau, nous avons assisté à une dissolution de cette gelée et à la mise en liberté des spores; celles-ci ne tardent pas à germer.

Dans des conditions spéciales et surtout quand l'atmosphère est très humide, la germination est prématurée et nous avons pu observer les faits suivants: les conidies ovales et monocellulaires au début commencent à s'allonger; en leur milieu apparaissent transversalement deux bourrelets cellulodiques partant des côtés opposés de la membrane; ces bourrelets grandissent, le protoplasme se sépare et une cloison naît; dans certains cas d'humidité favorable, nous avons pu voir des conidies s'allongeant beaucoup et prendre des dimensions de

5 à 6 fois supérieures à leur grandeur normale; ce phénomène peut se passer à l'intérieur de cette agglomération formée par les spores; deux cloisons peuvent naître en même temps dans la même spore; nous trouvons des amas renfermant des conidies mono-, bi- et tricellulaires; elles sont très résistantes tant que l'atmosphère où elles vivent reste humide. En déposant au fond de nos cultures des traces de sulfate de calcium anhydre, afin d'opérer l'absorption de l'humidité du milieu et de l'atmosphère de la cellule, nous avons pu assister à l'éclatement de ces pseudo-boules et à la mise en liberté des conidies.

L'allure générale de l'organisme telle que nous venons de la décrire a beaucoup d'analogie avec celle des *Acrostalagmus*. Dans les cultures âgées, les verticilles reproducteurs s'enchevêtrent et les boules se réunissent en amas; ce qui donne à la culture une coloration gris-jaunâtre.

Etant donnée la difficulté de détermination des *Fusarium* et nous rappelant du polymorphisme de ces organismes sur les différents milieux de culture, nous avons voulu voir si l'évolution de notre champignon serait différente sur un milieu différent; nous avons pensé dans ce but devoir nous rapprocher des milieux végétaux et nous nous sommes adressé au jus de pomme de terre gélosé; les cultures ont été faites dans des petites fioles cylindriques à ajutage latéral (fig. 4) des deux faces opposées, l'une était fixe, constituant le fond de notre récipient de culture; l'autre face était constituée par une lamelle amovible, pouvant se coller sur un rebord pratiqué à cet effet; on a fixé la lamelle au moyen de blanc d'œuf, l'ajutage a été bouché au coton et nous avons stérilisé l'appareil à l'autoclave à la température de 120° pendant 20 minutes afin de rester dans des conditions de stérilité rigoureuse; ensuite on a complété la fixation de la lamelle par de la cire à cacheter. Une goutte de jus de pomme de terre gélosé a été introduite sur la face inférieure de la lamelle par l'ajutage, ceci aseptiquement; puis nous avons repiqué notre *Fusarium* et surveillé son évolution.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, à la température du laboratoire, on peut voir un début de croissance; trois jours après, le mycélium tapisse entièrement la lamelle. L'examen microscopique nous a donné les caractères suivants: Mycélium cloisonné, ramifié; les filaments voisins s'anastomosent très souvent et arrivent à un enchevêtrement extraordinaire; au début nous observons très rarement la formation d'appareils reproducteurs décrits plus haut mais cette fois, le plus souvent les rameaux fertiles donnent des ramifications formées de branches cloisonnées intriquées, rameuses (pl. II, fig. 12), donnant à l'ensemble un aspect multilobé; de ces branches sortent des arbuscules portant des spores; les stérigmates ont toujours la même forme et le même aspect ressemblant à une poire (pl. II, fig. 13), les conidies étant

insérées sur la pointe; là encore, nous avons pu voir l'agglomération des conidies en globules; leur forme est différente de celle que nous venons de décrire à propos de la culture sur milieu ammoniacal peptoné maltosé; ici nous avons affaire à des croissants, sortes de fuseaux arqués aux extrémités en forme de becs (pl. II, fig. 14); elles sont le plus souvent pluricellulaires (de 2 à 5 cloisons).

Sur milieux pauvres et en anaérobie, nous avons observé des filaments mycéliens donnant des ramifications à l'extrémité desquelles se produisait un renflement; quelque temps plus tard ce renflement se cloisonnait, donnant naissance à deux cellules (chlamydospores) (pl. II, fig. 15) à contenu granuleux et dont la paroi est échinulée; ces éléments offrent un aspect assez curieux rappelant certaines formes en mycogone décrites chez les *Hypomyces*.

Sur le milieu ammoniacal peptoné maltosé, nous avons pu mettre en évidence des filaments se fragmentant après s'être cloisonnés transversalement, donnant naissance à des cellules rectangulaires qui arrondissent leurs angles; nous avons isolé des éléments semblables et nous les avonsensemencé en goutte pendante; on a pu assister à leur germination et à la formation d'un filament mycélien.

Pour avoir une donnée sur la poussée de l'organisme et son aspect nous avons effectué des cultures en cellules sur des coupes de pomme de terre. L'examen a été pratiqué au bout de 8, 15, 20 jours; en outre, la même opération a été faite sur des coupes de tige de haricot; on a examiné après 20, 45, 70 jours. Nous avons pu constater les faits suivants :

Il apparaît des filaments sur lesquels naissent des stérigmates au nombre de deux, puis, en suivant l'évolution, ceux-ci peuvent aller jusqu'au nombre de 4 (pl. II, fig. 12 et 13); ces stérigmates se développent alors, tandis que souvent l'axe principal s'arrête dans sa croissance. Les rameaux primaires donnent naissance à des rameaux secondaires insérés eux aussi en verticilles de 4; sur ces rameaux apparaissent les mêmes formations qui donnent des conidies; nous avons affaire à des hyphes conidiophores à quatre rameaux verticillés.

En ce qui concerne les conidies, au commencement de leur formation (état jeune) on voit souvent des formes à deux ou trois cloisons, mais déjà au bout de 15 jours on a pu compter 60 % de conidies à 5 cloisons, 10 % à 4, 20 % à 3, 10 % à 2 cloisons. Dans les cultures, entre le 15^e jour et le 45^e jour après l'ensemencement on constate de 80 à 90 % de conidies à 5 cloisons; le reste est 3 ou 4 septé. Le point d'insertion des conidies sur le stérigmate a la forme d'un pied d'enfant (pl. II, fig. 16). Les masses de spores prennent une coloration qui va du jaune ocreux au jaune orangé. On trouvera dans

le tableau suivant la dimension de la plupart des éléments décrits ci-dessus :

Filaments mycéliens : 2 μ , 5 à 5 μ de large ; longueur très variable.

Conidies 5-septées : longueur 25 à 40 μ

largeur 6 à 7 μ

Conidies 3-septées : longueur 17 à 30 μ

largeur 4 à 5 μ

Chlamydospores : diamètre 8 à 12 μ

Caractères biologiques :

Optimum de croissance : L'optimum de croissance se trouve compris entre $+22^{\circ}$ et $+27^{\circ}$. La croissance est arrêtée à $+42^{\circ}$.

Concentration en ions H des milieux de culture : La détermination de la concentration optima en ions H a été effectuée sur le milieu ammoniacal peptoné maltosé ; l'optimum est situé au voisinage de $\text{pH}=5,5$.

Caractères sur les différents milieux :

Les cultures ont été effectuées sur différents milieux qui passent pour être favorables à la croissance des *Fusarium*.

Sur milieu de lait-riz la croissance est très bonne et le mycélium pousse en surface et dans la profondeur du milieu ; au début la coloration est blanchâtre et l'aspect de la culture est duveté ; à mesure que celle-ci vieillit, on assiste à un changement de teinte qui passe par le vert pâle au jaune orange ; à ce moment le champignon vit en donnant une croûte brunâtre qui, dissociée et examinée au microscope, révèle la présence de nombreuses conidies en forme de lentilles insérées sur des tubercules rameux ; d'autre part les conidies sont pour la plupart agglutinées en boules et présentent l'aspect que nous avons décrit précédemment.

Sur milieu ammoniacal glucosé, l'organisme pousse mal, l'évolution est chétive (pl. II, fig. 18).

Nous avons ensuite ensemencé l'organisme sur milieu ammoniacal glucosé-matières fécales, afin de voir si l'addition d'une petite quantité de matières fécales serait favorable à sa croissance ; le deuxième jour un début de voile se forme qui envahit, le quatrième jour, toute la surface du milieu ; cette couche blanchâtre, en tous ses points, au début, montre de petites masses grisâtres çà et là. L'examen microscopique nous a révélé la présence d'appareils reproducteurs en verticilles réguliers, et d'une grande quantité de chlamydospores.

De ces expériences nous pouvons conclure que nous avons affaire à une espèce de *Fusarium* qui, par les caractères suivants, se rapproche beaucoup de *Fusarium polymorphum* MATRUCHOT 1892 et de *Fusarium rubiginosum* décrit par APPEL et WOLLENWEBER :

1^o Présence de conidies pluricellulaires, le plus souvent 5-septées en forme de ramifications allant jusqu'au nombre de quatre ou sur des arbuscules sporifères naissant isolément sur le mycélium. Les conidies ont leurs extrémités en forme de becs; le point d'insertion est invaginé; leur membrane est résistante; leur courbure est ellipsoïdale; le plus grand diamètre est situé au centre ou à leur partie supérieure.

II. Présence d'éléments offrant beaucoup d'analogie avec la forme mycogone des *Hypomyces*; MATRUCHOT considère ces formes comme des chlamydospores aériennes naissant sur des ramifications terminales, à la place des conidies.

III, Formation de chlamydospores mycéliennes souvent réunies en chaînettes (pl. II, fig. 17).

IV. Désarticulation de certains filaments mycéliens en cellules rectangulaires à coins arrondis, capables de germer. MATRUCHOT les appelle des arthrospores.

Action sur la cellulose :

Nous nous sommes servi des milieux suivants :

Cellulose pure	10 gr.
Chlorure de sodium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie	0 gr. 50
Chlorure d'ammoniaque	1 gr.
Eau	1000 cc.

Le champignon ensemencé, nous l'avons laissé croître pendant 60 jours; au bout de ce temps la cellulose qui avait passé du blanc au jaune brun se désagrégeait par agitation; nous en avons conclu que notre *Fusarium* exerçait une attaque sur celle-ci. Afin de nous rendre compte des conditions les plus favorables pour l'attaque de cet hydrate de carbone par le champignon, nous avons procédé aux recherches suivantes, dans un milieu contenant :

Cellulose pure	10 gr.
Chlorure de sodium	1 gr.
Phosphate monopotassique	1 gr.
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 50
Eau	1000 cc.

Nous avons dans chacune de nos expériences ajouté une substance quaternaire différente.

Première expérience

La première expérience a duré 4 mois ; elle a été faite avec des cultures en aérobie dont une partie a été placée à la température du laboratoire, les autres à +27°. A la fin de la période de culture,

nous avons dosé la cellulose restante par le procédé que nous avons décrit dans le chapitre des méthodes et techniques générale. Le tableau qui suit donne les résultats que nous avons obtenus :

Milieu initial + Sulfate d'ammoniaque à la concentration de 1 ‰.

Température du laboratoire.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	85 jours		1 gr.	0,783	0,217	21,7
2 ^o	95 »		1 gr.	0,775	0,225	22,5
3 ^o	110 »		1 gr.	0,803	0,197	19,7
4 ^o	125 »		1 gr.	0,641	0,359	35,9

Même milieu.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,681	0,319	31,9
2 ^o	98 »		1 gr.	0,693	0,307	30,7
3 ^o	115 »		1 gr.	0,627	0,373	37,3
4 ^o	127 »		1 gr.	0,594	0,406	40,6

Deuxième expérience.

Milieu initial + Nitrate de potassium.

Température du Laboratoire.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	85 jours		1 gr.	0,517	0,483	48,3
2 ^o	95 »		1 gr.	0,404	0,596	59,6
3 ^o	110 »		1 gr.	0,395	0,605	60,5
4 ^o	125 »		1 gr.	0,362	0,638	63,8

Même milieu.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,464	0,536	53,6
2 ^o	98 »		1 gr.	0,486	0,514	51,4
3 ^o	115 »		1 gr.	0,355	0,645	64,5
4 ^o	127 »		1 gr.	0,299	0,701	70,1

Troisième expérience

Milieu initial + Nitrate d'ammoniaque à 1 %.

Température du laboratoire.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	85 jours	1 gr.	0,505	0,495	49,5
2 ^o	95 »	1 gr.	0,532	0,468	46,8
3 ^o	110 »	1 gr.	0,468	0,532	53,2
4 ^o	125 »	1 gr.	0,353	0,647	64,7

Même milieu.

Température : +27^o.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours	1 gr.	0,456	0,544	54,4
2 ^o	98 »	1 gr.	0,425	0,575	57,5
3 ^o	115 »	1 gr.	0,320	0,680	68,0
4 ^o	127 »	1 gr.	0,279	0,721	72,1

Quatrième expérience.

Milieu initial + asparagine.

Température du laboratoire.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	85 jours	1 gr.	0,416	0,584	58,4
2 ^o	95 »	1 gr.	0,402	0,598	59,8
3 ^o	110 »	1 gr.	0,327	0,673	67,3
4 ^o	125 »	1 gr.	0,254	0,746	74,6

Même milieu.

Température : +27^o.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours	1 gr.	0,350	0,650	65,0
2 ^o	98 »	1 gr.	0,279	0,721	72,1
3 ^o	115 »	1 gr.	0,153	0,847	84,7
4 ^o	127 »	1 gr.	0,175	0,825	82,5

Cinquième expérience

Milieu initial + peptones.

Température du laboratoire.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	85 jours		1 gr.	0,383	0,617	61,7
2 ^o	95 »		1 gr.	0,268	0,732	73,2
3 ^o	110 »		1 gr.	0,285	0,715	71,5
4 ^o	125 »		1 gr.	0,187	0,813	81,3

Même milieu.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,246	0,754	75,4
2 ^o	98 »		1 gr.	0,185	0,815	81,5
3 ^o	115 »		1 gr.	0,128	0,872	87,2
4 ^o	127 »		1 gr.	0,042	0,958	95,8

Les mêmes expériences ont été répétées au moyen des milieux au sulfate d'ammoniaque, au nitrate d'ammoniaque qui constituent le premier le plus mauvais, le second le meilleur des milieux minéraux pour l'attaque de la cellulose, au moyen du milieu aux peptones qui est le plus favorable à la dégradation de l'hydrate de carbone expérimenté d'entre les milieux organiques essayés ; à ces divers milieux nous avons ajouté outre notre cellulose un autre hydrate de carbone, simple celui-là : le glucose pour voir comment se comportait le champignon vis-à-vis de la cellulose quand on lui fournissait pour ses besoins un sucre simple en même temps qu'un polysaccharide complexe ; nous avons obtenu les résultats suivants :

Sixième expérience

Milieu initial + sulfate d'ammoniaque 1 % + glucose 1 %.

Température +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,845	0,155	15,5
2 ^o	98 »		1 gr.	0,806	0,194	19,4
3 ^o	115 »		1 gr.	0,822	0,178	17,8
4 ^o	127 »		1 gr.	0,733	0,267	26,7

Septième expérience

Milieu initial + *nitrate d'ammoniaque* + *glucose* à 1 %.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,574	0,426	42,6
2 ^o	98 »		1 gr.	0,511	0,489	48,9
3 ^o	115 »		1 gr.	0,363	0,637	63,7
4 ^o	127 »		1 gr.	0,340	0,660	66,0

Huitième expérience

Milieu initial + *peptone* + *glucose* à 1 %.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,463	0,537	53,7
2 ^o	98 »		1 gr.	0,349	0,651	65,1
3 ^o	115 »		1 gr.	0,297	0,703	70,3
4 ^o	127 »		1 gr.	0,315	0,685	68,5

Constatant l'influence défavorable de l'addition de 1 % de glucose dans nos milieux sur la dégradation de la cellulose par l'organisme étudié, il nous a paru intéressant d'augmenter la proportion de glucose ajouté et ainsi nous sommes passé de la concentration 1 % à celle de 5 % ; les tableaux suivants expriment nos résultats :

Neuvième expérience

Milieu initial + *sulfate d'ammoniaque* + *glucose* à 5 %.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,987	0,013	1,30
2 ^o	98 »		1 gr.	0,810	0,019	1,9
3 ^o	115 »		1 gr.	0,978	0,022	2,2
4 ^o	127 »		1 gr.	0,979	0,021	2,1

Dixième expérience

Milieu initial + *nitrate d'ammoniaque* + *glucose* à 5 %

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,625	0,375	37,5
2 ^o	98 »		1 gr.	0,550	0,450	45,0
3 ^o	115 »		1 gr.	0,504	0,496	49,6
4 ^o	127 »		1 gr.	0,486	0,514	51,4

Onzième expérience :

Milieu initial + *peptones* + *glucose* à 5%.

Température : + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,607	0,393	39,3
2 ^o	98 »		1 gr.	0,575	0,425	42,5
3 ^o	115 »		1 gr.	0,513	0,487	48,7
4 ^o	127 »		1 gr.	0,469	0,531	53,1

De toutes ces expériences nous pouvons conclure :

I. Le *fusarium* considéré dégrade dans tous les cas plus rapidement la cellulose à + 27° qu'à la température du laboratoire.

II. Si nous considérons les diverses sources d'azote dont nous avons fait usage nous voyons que :

a) Le sulfate d'ammoniaque représente 21% d'azote.

b) Le nitrate de potassium représente 14% d'azote.

c) Le nitrate d'ammonium représente 35% d'azote.

De plus faisons remarquer ici que ce sel renferme de l'azote sous forme d'acide et sous forme de base.

d) L'asparagine (produit organique dégradé) représente 9% d'azote.

e) La peptone représente 15 à 20% d'azote.

En nous reportant aux différents tableaux précédents, nous pouvons dire que le pourcentage en azote des corps considérés n'a aucune influence sur la dégradation de la cellulose. Ici c'est la qualité de l'aliment azoté qui jouera beaucoup plus que la quantité d'azote qu'il est susceptible de renfermer. Ceci se trouve prouvé surtout pour l'asparagine et la peptone qui sont des produits organiques renfermant de l'azote en très petite quantité; malgré cela le champignon dégrade une plus grande quantité de cellulose en leur présence qu'en

présence des autres aliments plus riches en azote. En ce qui concerne les sels minéraux, le fusarium en expérience préfère de beaucoup pour accomplir sa fonction cellulophage, l'azote qu'on lui offre sous la forme acide; l'azote à lui donné sous forme de base semble être l'aliment le moins favorable à cette dégradation.

III. L'apport de petites quantités de glucose (1%) fait baisser considérablement la dégradation du polysaccharide dans le milieu au sulfate d'ammoniaque. A cette concentration le glucose n'apporte pas de changements très appréciables dans les milieux au nitrate d'ammoniaque et aux peptones; par contre à la concentration de 5% dans ces solutions nutritives le glucose est cause d'une diminution notable de l'action du champignon sur la cellulose.

Dans nos recherches antérieures nous avons remarqué l'effet nettement favorable, pour les cultures, produit par l'addition d'extrait de matières fécales au milieu. Nous avons donc fait de nouvelles expériences en additionnant notre milieu initial de 250 pour 1000 d'extrait de matières fécales préparé suivant la technique indiquée dans le chapitre des méthodes générales; nous y avons ajouté respectivement dans chacune de nos expériences un corps azoté différent : on a employé ici le sulfate d'ammoniaque, le nitrate d'ammoniaque et la peptone. Nous exprimons nos résultats dans les tableaux ci-dessous :

Douzième expérience :

Milieu initial + extrait de matières fécales + sulfate d'ammoniaque
Température : + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,490	0,510	51,0
2 ^o	98 »		1 gr.	0,465	0,535	53,5
3 ^o	115 »		1 gr.	0,376	0,624	62,4
4 ^o	127 »		1 gr.	0,348	0,652	65,2

Treizième expérience :

Milieu initial + extrait de matières fécales + nitrate d'ammoniaque
Température + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,370	0,630	63,0
2 ^o	98 »		1 gr.	0,316	0,684	68,4
3 ^o	115 »		1 gr.	0,209	0,791	79,1
4 ^o	127 »		1 gr.	0,143	0,857	85,7

Quatorzième expérience :

Milieu initial + extrait de matières fécales + peptones

Température : + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,308	0,792	79,2
2 ^o	98 »		1 gr.	0,143	0,857	85,7
3 ^o	115 »		1 gr.	0,117	0,883	88,3
4 ^o	127 »		1 gr.	0,062	0,938	93,8

Ces tableaux montrent que l'addition de petites quantités de matières fécales sous forme d'extrait produisent une augmentation notable de la dégradation de la cellulose par notre *Fusarium* dans les milieux au sulfate d'ammoniaque et au nitrate d'ammoniaque; en ce qui concerne le milieu à la peptone, les résultats sont à peu de choses près équivalents.

Devant ces faits nous avons répété ces recherches en anaérobie, en employant le milieu initial additionné d'extrait de matières fécales à la même dose que plus haut; nous nous sommes servi pour cela des deux substances azotées qui se sont montrées les plus favorables à la dégradation de la cellulose dans nos expériences: nitrate d'ammoniaque et peptone :

Vie anaérobie :

Quinzième expérience :

Milieu initial + extrait de matières fécales + nitrate d'ammoniaque

Température du laboratoire

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,692	0,308	30,8
2 ^o	98 »		1 gr.	0,608	0,392	39,2
3 ^o	115 »		1 gr.	0,566	0,434	43,4
4 ^o	127 »		1 gr.	0,437	0,563	56,3

Même milieu.

Température : + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,521	0,479	47,9
2 ^o	98 »		1 gr.	0,435	0,565	56,5
3 ^o	115 »		1 gr.	0,440	0,560	56,0
4 ^o	127 »		1 gr.	0,379	0,621	62,1

Seizième expérience :

Milieu initial + extrait de matières fécales + peptones

Température du laboratoire

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,429	0,571	57,1
2 ^o	98 »		1 gr.	0,458	0,542	54,2
3 ^o	115 »		1 gr.	0,322	0,678	67,8
4 ^o	127 »		1 gr.	0,280	0,720	72,0

Même milieu.

Température : + 27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,411	0,589	58,9
2 ^o	98 »		1 gr.	0,344	0,656	65,6
3 ^o	115 »		1 gr.	0,295	0,705	70,5
4 ^o	127 »		1 gr.	0,213	0,787	78,7

Il est aisé de voir d'après les tableaux précédents que la vie en anaérobie amène un ralentissement et une diminution dans le processus de dégradation de la cellulose par le *Fusarium* en étude.

Ici aussi, à + 27°, l'attaque est nettement plus forte que dans le cas de la température ordinaire.

L'organisme que nous avons isolé de *Cossus cossus* LINNÉ se rapproche par tous ces caractères de *Fusarium polymorphum* MATRUCHOT et de *Fusarium rubiginosum* APPEL et WOLLENWEBER. Il diffère du premier par ses conidies 5-septées (MATRUCHOT indique des conidies 5-septées; MARCHAL mentionne seulement des conidies 3-septées) et du second par la présence de chlamydospores en mycogone. Nous ne croyons pas devoir en faire une espèce nouvelle.

Il possède un pouvoir dégradateur élevé vis-à-vis de la cellulose et les meilleures conditions d'attaque de ce polysaccharide se manifestent lorsque l'organisme est cultivé sur milieu renfermant comme source d'azote la peptone, à la température de + 27°

Toutefois, en présence d'une petite quantité d'extrait de matières fécales et de nitrate d'ammoniaque, l'attaque de la cellulose est importante.

La vie en aérobie favorise nettement le phénomène.

CHAPITRE IV

Microorganismes cellulophages isolés de *Sciapteron tabaniformis* Rott

1^o *Mucor alternans* Van Tieghem.

2^o *Mucor piriformis* Rabenhorst.

3^o *Fusarium metachroum* Appel et Wollenweber.

CHAPITRE IV

1) *Mucor alternans* VAN THIEGHEM.

Continuant nos recherches afin de nous rendre compte de la flore intestinale des larves xylophages nous avons eu recours à la larve d'un autre insecte connu comme lignivore ; *Sciapteron tabaniformis* ROTT, nous avons employé la même technique opératoire que pour les larves de *Cossus ligniperda*. Il nous a été donné d'isoler du tube digestif de cette espèce deux autres *Oomycètes* de la classe des *Mucorinées* qui nous ont paru jouer un rôle important dans l'hydrolyse et l'assimilation de la cellulose ; ayant trouvé ces deux espèces constamment et à différentes époques dans l'évolution de la larve, nous sommes en droit de penser qu'il s'agit ici d'une symbiose entre l'insecte et ces champignons.

Ces deux champignons ont été examinés morphologiquement et biologiquement et nous décrirons pour commencer les caractères de l'un d'eux qui exerce sur la cellulose un pouvoir dégradateur très prononcé.

Après isolement et purification du champignon par les procédés de lavage, nous avons effectué des cultures répétées sur milieux appropriés afin de fixer les caractères de l'espèce ; au cours de ces recherches nous avons constaté que le meilleur aliment pour l'espèce considérée était la maltose ; pour cette raison nous avons fait des cultures en cellule sur milieu de *Raulin* maltosé afin de déterminer les différents caractères morphologiques de l'espèce :

Mycélium très ramifié composé au début de filaments d'abord dressés puis s'incurvant et donnant naissance à un nouveau rameau ; de semblables ramifications alternant régulièrement à droite et à gauche se répètent sur l'axe primaire une dizaine de fois (Pl. III, 1) ; elles diminuent de longueur à mesure qu'elles s'éloignent de la base ; chaque rameau se termine finalement par un sporange (Pl. III, 2). Ces filaments atteignent une longueur de 3 à 7 millimètres à leur état adulte ; les rameaux secondaires sont très variables, tantôt courts et dressés, tantôt plus ou moins longs et enroulés, souvent même ramifiés en forme de fourche ; la membrane des filaments est lisse,

incolore ; le protoplasme à l'état jeune est granuleux, renfermant des corpuscules fixant électivement les colorants nucléaires ; à l'état adulte, la membrane s'épaissit, le protoplasme se fluidifie et renferme une abondance de graisses. Les cloisons sont très rares et se forment avec l'âge à la base des rameaux secondaires sans se prolonger sur l'axe primaire. Les sporanges sont sphériques et de dimension



(Fig. 12) — *Mucor alternans*

variable ; les plus âgés, rapprochés de la base possèdent le plus grand diamètre (14 à 16 μ) la membrane est incrustée de cristaux et se gélifie à maturité laissant à la base de l'insertion une colerette. Les sporanges supérieurs sont de taille moindre (de 8 à 10 μ) à membrane consistante et se désagrégeant très difficilement. Ces derniers sont lisses. La columelle (PL III, 3) est sphérique, incolore et sans aucune protubérance ou incrustation, entourée à la base d'une colerette, vestige de la membrane du sporange. Le diamètre

de cette columelle est de 7 à 12 μ . Chaque sporange renferme un grand nombre de spores qui sont elliptiques, incolores, lisses et mesurant de 2 à 3 μ . de large et de 5 à 7 μ . de long.

Les caractères morphologiques les plus remarquables de cette espèce sont : l'alternance presque régulière des ramifications secondaires et la forme elliptique des spores. (Fig. 12).

Caractères biologiques

Optimum de croissance : L'optimum de croissance a été constaté entre $+25^{\circ}$ et $+27^{\circ}$. La croissance se trouve inhibée pour des températures supérieures à $+43^{\circ}$ pour les formes mycéliennes; les formes de souffrance peuvent végéter jusqu'à $+55^{\circ}$ et à la limite inférieure de $+7^{\circ}$.

Concentrations en ions H des milieux de cultures

La détermination de la concentration optima en ions H a été effectuée sur le milieu de liquide de *Raulin* maltosé sur lequel le champignon nous a donné une récolte maxima après 25 jours de culture. Cet optimum de concentration est situé au voisinage du pH = 6,0.

Caractères morphologiques sur les différents milieux

Nous avons effectué nos essais sur des milieux liquides et solides usuels de laboratoire. Dans une solution renfermant comme hydrate de carbone du glucose le champignon ne s'est jamais reproduit par un mycélium végétatif; au contraire, il a pris des formes de souffrance constituées par des files des cellules sphériques et bourgeonnantes. Ce produit ne semble donc guère favorable à la fructification de l'espèce étudiée. En effet, sur milieu de *Sabouraud* glucosé ou sur milieu de *Raulin* glucosé gélosé, nous n'avons obtenu que des cultures extrêmement chétives, ne formant pas de sporanges. Sur milieu de *Raulin* saccharosé par contre le champignon se développe exclusivement en mycélium de même que sur milieu peptoné saccharosé. Mais la formation des sporanges ne se fait que très tôt, au début de la culture et paraît se produire seulement aux dépens des matières quaternaires se trouvant dans le milieu; aussitôt que l'alcalinisation du milieu se produit par la libération des ions ammoniacaux en résultant, toute nouvelle fructification cesse ou est interrompue; ceci nous prouve que le *Mucor* étudié n'est pas capable de décomposer et d'invertir la saccharose et qu'il est incapable, ne sécrétant pas d'invertine, d'assimiler ce disaccharide.

Nos expériences se sont poursuivies sur milieu de *Raulin* maltosé et sur milieu de *Sabouraud* maltosé: le champignon se dé-

veloppe d'une façon très luxuriante formant des nouveaux appareils sporangifères quel que soit l'âge de la culture. Nous avons pu suivre cette formation sur des prélèvements effectués dans des cultures de 30 et 40 jours.

Le champignon a été ensuite ensemencé sur milieu de *Raulin* renfermant comme hydrate de carbone de l'empois d'amidon ou de la dextrine. Sur ces milieux il forme très vite des filaments mycéliens donnant d'abord naissance à des hypes fructifères mais bientôt le mycélium se cloisonne, donnant une série d'articles qui se gonflent, prennent une forme cylindrique qui plus tard se disloquent les uns des autres, s'arrondissent et constituent des cellules levures à membrane très épaisse. Sur milieu lactosé et levulosé le développement ne se fait guère.

Milieux azotés

Le milieu nitraté a été le même que celui que nous avons utilisé pour la culture du *Mucor spinosus* ; ici le saccharose a été remplacé par du glucose pour donner à notre organisme un élément énergétique convenable. La croissance a été très lente ; le champignon présente de nombreuses chlamydospores et des formes en levures, la culture prend le même aspect que sur la solution glucosée. Ceci nous permet de conclure que le champignon n'utilise guère l'azote qu'on lui fournit sous la forme d'un sel nitraté.

Sur milieu ammoniacal, semblable au précédent, dans lequel le nitrate de potasse a été remplacé par du sulfate d'ammonium à poids moléculaire égal, l'organisme a présenté une culture luxuriante, formant en abondance des appareils reproducteurs asexués. En présence de glucose, il paraît capable d'assimiler directement l'ammoniaque qu'il transforme en albumine fungique ; la protéolyse se trouve très retardée par suite de la capacité du champignon à décomposer la molécule de glucose pour neutraliser les ions alcalins mis en liberté. Des examens microscopiques nous ont montré en effet, même dans des cultures très âgées, une prédominance des filaments mycéliens composés de cellules jeunes à protoplasme granuleux, phénomène montrant que l'organisme peut utiliser très longtemps le milieu pour ses besoins par suite de la capacité d'équilibrer la concentration des ions alcalins et des ions acides résultant de l'assimilation des matières ternaires et quaternaires.

Ici encore, en ce qui concerne les milieux peptonés, cet *Oomycète* peut garder toute sa vitalité en présence de peptones seuls ; en y ajoutant des hydrates de carbone dégradables par le champignon, on forme un milieu de choix fournissant des récoltes optima.

Sur lait le *Mucor* forme une présure et une caséase.

Après avoir étudié les caractères morphologiques et biologiques de l'espèce considérée et comparant nos résultats avec les propriétés décrites par RABENHORST (61) d'une part, GAYON et DUBOURG (23) de l'autre, nous sommes en droit de conclure que nous avons affaire à *Mucor alternans* VAN TIEGHEM 1887.

Nous avons ensuite voulu constater l'action assimilatrice du *Mucor alternans* vis-à-vis de différents sucres avant de passer aux recherches sur l'action de cet organisme sur la cellulose.

Etude de l'action sur les hydrates de carbone :

Nous avons utilisé le milieu liquide ammoniacal dans lequel nous avons respectivement ajouté les hydrates de carbone suivants :

Saccharose	5 gr.	%
Glucose	3 gr.	»
Maltose	5 gr.	»
Lactose	5 gr.	»
Amidon	2 gr. 5	»
Dextrine	5 gr.	»

Le mode opératoire a été identique à celui utilisé antérieurement et les résultats obtenus ont été en concordance avec les phénomènes observés au moyen de l'étude microscopique.

Dans le milieu à base de saccharose nous avons constaté au moyen du procédé de BERTRAND par la liqueur de FEHLING et du procédé polarimétrique qu'avant et après culture la quantité de saccharose a été constante. Donc le champignon est incapable de produire une interversion de ce sucre.

En ce qui concerne le glucose, les dosages effectués par la méthode de BERTRAND et la méthode polarimétrique ont donné les résultats suivants :

1 ^{er} jour de culture	3,0 gr.	% de milieu
10 ^e »	1,25 »	»
20 ^e »	0,60 »	»
30 ^e »	0,10 »	»

Les résultats précédents montrent qu'une quantité de glucose élevée a disparu du milieu; en même temps nous avons pu constater dans le milieu un abondant dégagement gazeux, indice d'une fermentation alcoolique produite par le champignon en présence du glucose; afin de nous rendre compte du phénomène nous avons effectué des recherches qualitatives et quantitatives d'alcool. Les méthodes

employées ont été celles indiquées antérieurement et nous avons pu mettre en évidence aux différentes périodes de croissance des cultures les quantités d'alcool suivantes :

10 ^e jour de culture	0,80 gr. % de milieu
20 ^e » »	1,10 » »
30 ^e » »	1,25 » »

Ceci nous prouve que la plus grande quantité du glucose du milieu a été transformée en alcool; ayant ainsi vu que le champignon peut produire une fermentation alcoolique et vivre dans un milieu renfermant une notable proportion d'alcool, nous l'avons mis en présence d'une forte proportion de glucose, et nous avons pu constater que l'organisme était capable d'agir comme ferment, tant que la quantité d'alcool formée dans le milieu ne dépassait pas 4,2 %.

Nous avons en outre cultivé le *Mucor alternans* sur les mêmes milieux à la température de + 27° en anaérobie et dans ces conditions le pouvoir fermentatif s'est manifesté avec une accélération notable : en 15 jours 3 grammes de glucose existant dans le milieu au début de la culture avaient complètement disparu. L'organisme garde toute sa vitalité avec des quantités de 8 à 10% d'alcool dans le milieu.

Dans le milieu contenant comme hydrate de carbone du maltose nous n'avons jamais pu mettre en évidence des monosaccharides; la réaction des osazones pratiquée dans les solutions nutritives au cours de l'évolution du *Mucor* nous a toujours donné des cristaux que nous avons identifié microscopiquement et par leurs constantes physiques comme des maltosazones. Les méthodes de séparation que nous avons employé afin de déceler la présence possible de glucosazone nous ont toujours donné des résultats négatifs; par contre les cultures âgées renfermant du maltose aboutissaient à une fermentation alcoolique plus intense que celle constatée avec le glucose, en tenant compte des proportions de matériaux mis en œuvre. L'excès de la production de zymase a été constaté aussi cette fois par la vie en anaérobie. Le *Mucor alternans* est par conséquent capable d'assimiler le maltose directement sans passer par le stade monosaccharide; ce sucre est directement fermentescible par l'organisme.

Sur milieu à base de lactose *Mucor alternans* pousse lentement et offre un aspect chétif; il donne un mycélium blanchâtre en surface, il se produit une ébauche de voile, mais celui-ci n'arrive pas à se former complètement. Au bout d'une vingtaine de jours de culture le mycélium tombe au fond du vase de culture; il ne s'est pas formé d'appareils reproducteurs. Les dosages effectués à différentes époques de culture dans les milieux nous ont donné avec 13,20 cc. de notre milieu une réduction totale de 100 cc. de liqueur de FEHLING, sachant que 0,67 gramme de lactose réduisent 100 cc. de liqueur

de FEHLING, nous pouvons conclure que le lactose est resté inattaqué intégralement dans le milieu; d'autre part, la réaction des ozones pratiquées à différents stades de l'évolution du champignon nous a prouvé l'absence de tout autre sucre.

De ces expériences nous pouvons déduire que le *Mucor alternans* est incapable d'assimiler le lactose.

Sur le milieu à l'amidon (empois) nous avons très tôt constaté des bulles de gaz. Ceci nous prouve qu'une fermentation a lieu; pour mettre en évidence les différents stades de dégradation, nous avons utilisé les méthodes déjà décrites à propos du *Mucor spinosus*. Une culture de 20 jours a été filtrée et le résidu restant sur le filtre a été lavé au moyen d'eau chaude jusqu'à ce que l'eau de lavage ne produisait plus de réduction de la liqueur de FEHLING; dans le filtrat obtenu, renfermant les sucres solubles dans l'eau, nous avons pu caractériser du maltose uniquement. Une autre portion de filtrat a été évaporée jusqu'à consistance sirupeuse et à l'aide de l'alcool à 90° nous avons précipité la dextrine qui a été caractérisée par la coloration rouge vineux en présence d'une solution iodo-iodurée diluée. N'ayant pu mettre en évidence du glucose et nous reportant à nos recherches antérieures qui nous ont démontré que le maltose est l'hydrate de carbone de choix pour l'organisme étudié, nous sommes en droit de conclure que le *Mucor alternans* hydrolyse l'amidon, passant par les stades de maltose et de dextrine qui, elle-même est saccharifiée; le maltose en résultant est directement transformé en alcool.

Dans notre milieu renfermant 10 grammes d'amidon, la quantité d'alcool existant le 30^e jour a été de 2 grammes 20 %.

Nous avons ensuite voulu examiner l'action du champignon sur la dextrine et pour cela nous avons employé les méthodes indiquées par VAN ITERSOM et PRINGSHEIM (59), afin de séparer le pouvoir hydrolysant de la fermentation. Dans ce but nous avons cultivé notre organisme sur un milieu renfermant 5 grammes de dextrine pour 100; après dix jours de culture on a ajouté à notre culture 10 cc. de toluène afin d'inhiber le pouvoir fermentatif. On a laissé en contact dix jours à + 37°, puis on a filtré et le filtrat a été divisé en deux parties : la première nous a servi pour mettre en évidence les caractères d'identité des sucres formés; la seconde partie a été mise en présence d'une solution de dextrine à 20%; la diastase existant dans notre milieu a exercé son action à + 55° sur la dextrine pour la saccharifier. Dans les deux cas nous avons mis en évidence l'hydrolyse de la dextrine en maltose comme terme définitif. Le maltose a été caractérisé par les réactions des osazones (solubilité dans l'eau, point de fusion).

Ainsi donc la dextrine se trouve transformée sous l'action du *Mucor alternans* en maltose, assimilable directement par l'organisme et fermentescible directement aussi en alcool.

Toujours en considérant la provenance de cet organisme et le but que nous nous sommes donné nous avons continué cette étude par des cultures sur milieux à base de cellulose.

Action assimilatrice du *Mucor alternans* vis-à-vis de la cellulose :

Guidés par nos travaux antérieurs, nous avons effectué ces recherches sur notre milieu cellulose-matières fécales en aérobie et en anaérobie.

La croissance du champignon est bonne; le troisième jour le mycélium s'étale à la surface du milieu nutritif; le sixième jour les hyphes sporangifères font leur apparition; elles atteignent une hauteur de 5 millimètres environ. L'examen microscopique montre un mycélium cloisonné; le champignon se montre sur ce milieu avec les mêmes caractères que ceux observés par nous sur milieu de RAULIN; toutefois la croissance n'est pas aussi importante et l'évolution de l'organisme est plus lente (50% environ). La récolte après 30 jours a donné des chiffres inférieurs d'un demi à ceux trouvés par ensemencement sur milieu de RAULIN. Ici encore, pour effectuer nos recherches sur l'hydrolyse et l'assimilation de la cellulose, nous avons employé le procédé de dosage pondéral, en comparant des milieux vierges et des milieux sur lesquels on a effectué les cultures, tout ces substrats ayant été placés dans les mêmes conditions pendant des périodes équivalentes. Après 30 jours de culture à + 27° le champignon a détruit 1,6 grammes pour 100 de cellulose. Ce chiffre exprime la moyenne trouvée au cours de 20 expériences.

Les mêmes recherches ont été effectuées en plaçant nos cultures en anaérobie; dans ce cas le *Mucor alternans* manifeste une activité vitale de beaucoup supérieure à + 27°; l'examen microscopique montre des hyphes plus grêles que celles observées en aérobie; les sporanges existants ont épaissi leur membrane et les membranes et les cloisons des divers filaments sont plus nombreuses. Par l'acide osmique et le triple colorant de GUEGUEN nous avons pu mettre en évidence une production de graisses très supérieure à la normale.

Les dosages effectués après 30 jours de culture nous ont donné des chiffres de cellulose disparue compris entre 3,25 et 3,50%.

On voit donc que la vie anaérobie permet à l'organisme étudié une dégradation plus intense de la cellulose; cette action passe à travers différents stades, il nous a paru intéressant de rechercher comment elle se fait.

Nous avons eu recours tout d'abord au procédé microchimique par mise en contact de fibres cellulósiques attaquées avec de la liqueur de FEHLING sur une lame de verre; par chauffage nous avons obtenu la réduction.

D'autre part, en vue de permettre l'accumulation des produits d'hydrolyse intermédiaires de la cellulose nous avons encore cette fois supprimé la fermentation en additionnant aux cultures, au moment où le dégagement gazeux s'est montré le plus fort (le dix-huitième jour), une quantité de xylol qui arrêta brusquement la fermentation; nous avons laissé en contact six jours à $+ 37^{\circ}$; nous avons filtré et prélevé le filtrat : celui-ci a servi pour la recherche des différents produits de dégradation; d'autre part, nous avons effectué sur ce liquide la recherche des diastases hydrolysant la cellulose en mettant en contact le liquide avec celle-ci : toutes ces recherches ne nous ont donné aucun résultat positif.

Nous avons alors pensé que l'action du champignon sur la cellulose était due à des endoferments. C'est alors que nous avons eu recours à la technique suivante : on a effectué une culture de dix-huit jours à $+ 27^{\circ}$ dans un milieu cellulose-matières fécales; on a ainsi excité l'organisme à produire les enzymes spécifiques. Le mycélium a été plasmolysé dans le milieu de culture au moyen d'une solution très concentrée de phosphate trisodique; nous avons laissé en contact pendant quatre heures, puis nous avons ajouté du xylol afin d'arrêter toute action fermentative; nous avons abandonné le tout à l'étuve à $+ 37^{\circ}$ pendant huit jours; nous avons examiné le liquide au moyen de la liqueur de FEHLING qui a été réduite; nous avons donc eu affaire à des endoferments que nous avons mis en liberté par la plasmolyse effectuée sur les cellules mycéliennes, et nous avons obtenu une accumulation des produits intermédiaires dus à ces endoferments en supprimant la fermentation par l'action de l'antiseptique. Le liquide obtenu a été divisé en plusieurs lots; sur le premier on a recherché les sucres réducteurs au moyen de la liqueur de FEHLING et la réaction s'est montrée positive. Nous nous sommes ensuite adressés à la réaction des osazones; le produit obtenu a été caractérisé par sa solubilité dans l'alcool, dans l'eau et par son point de fusion. Nous donnons dans le tableau suivant les résultats obtenus :

Solubilité dans l'eau : Positive.

Solubilité dans l'alcool : Positive.

Point de fusion : $+ 210^{\circ}$.

Ayant affaire avec un sucre réducteur, il ne pouvait s'agir ici que du glucose ou du maltose; les chiffres correspondants des osazones de ces deux produits sont exprimés ci-dessous :

	Glucose	Maltose
<i>Solubilité dans l'eau</i>	néant	positive
<i>Solubilité dans l'alcool</i>	positive	positive
<i>Point de fusion</i>	+ 230 à	+ 232° + 206°

En comparant les résultats que nous avons obtenus avec ceux qui se trouvent dans le tableau précédent, tout nous porte à croire que nous avons affaire au maltose.

Pour vérifier cette conclusion, nous avons prélevé 20 cc. de notre liquide initial, nous y avons ajouté 5 cc. d'acide chlorhydrique dilué et nous avons chauffé pour opérer l'hydrolyse. Par comparaison au polarimètre de la déviation de la solution initiale à celle du liquide traité par l'acide chlorhydrique, en tenant compte de la dilution due aux 5 cc. d'acide ajoutés, l'angle de déviation obtenu avec la seconde solution était constamment d'environ un tiers inférieur à l'angle donné par la solution primitive. La solution initiale et la solution hydrolysée ont été d'autre part employées pour opérer la réduction de la liqueur de FEHLING; si nous désignons par μ le nombre de cc. de liqueur initiale nécessaire pour obtenir la réduction de 20 cc. de liqueur de FEHLING, la même quantité de réactif sera réduite par $\mu/2$ cc. de liqueur hydrolysée. Devant ces faits nous nous croyons en droit de conclure que le *Mucor alternans* dégrade la cellulose jusqu'au stade maltose; ceci est d'autant plus plausible que le maltose, comme nos recherches antérieures nous l'ont prouvé, constitue un aliment ternaire de choix pour notre organisme. Ce maltose est ensuite, par l'action fermentative, directement décomposé en alcool et en CO².

Après avoir ainsi constaté que les produits de dégradation ultime sont différents de ceux trouvés lors de l'étude de l'action sur la cellulose du *Mucor spinosus*, nous nous sommes posé la question : La dégradation cellulosique passe-t-elle par le stade cellobiose ? Pour résoudre cette question, nous avons encore eu recours au procédé qui consiste à éliminer le maltose par fermentation et transformation en alcool au moyen du *Saccharomyces cerevisiae* qui est incapable de dégrader la cellulose. A cet effet nous avons employé une culture âgée de cinq jours à laquelle nous avons ajouté du toluène; cinq jours plus tard, la solution de FEHLING était réduite au moyen d'une petite quantité prélevée; nous avons ensuite concentré notre liquide par chauffage au bain-marie à + 60°; le liquide sirupeux a été précipité par l'alcool absolu; le précipité qui s'est formé est séché dans le vide, repris avec 250 cc. d'eau et ce liquide est porté

au moyen de l'acide chlorhydrique au $\text{pH} = 5,5$; ce milieu a été ensemencé au moyen de *Saccharomyces cerevisiae*, porté à l'étuve à $+ 37^{\circ}$; nous avons laissé en contact pendant quinze jours; à ce moment nous avons filtré et le filtrat a été évaporé à sec afin d'éliminer l'alcool formé; le résidu a été repris avec 50 cc. d'eau et nous avons effectué sur ce milieu la réaction des osazones qui nous a permis d'identifier le cellobiose. Le maltose a été, par la fermentation, transformé en alcool.

L'expérience a été renouvelée, en traitant cette fois-ci le résidu final repris par l'eau avec de l'émulsine; après trois jours de contact à $+ 37^{\circ}$, en présence de toluène, nous avons pu mettre en évidence du glucose; c'est une preuve de plus que nous avons affaire à la cellobiose et non au maltose.

Le *Mucor alternans* attaque donc la cellulose et ceci avec une intensité plus forte en anaérobie; la dégradation de ce polysaccharide passe par le stade cellobiose au maltose pour être transformé par la fermentation en alcool. Cette assimilation le distingue donc du *Mucor spinosus* qui lui, intervertit le cellobiose en glucose.

Conclusions : 1^o Caractères morphologiques :

Le champignon isolé du tube digestif de la larve de *Sciapteron tabaniformis* ROTT, après fixation de l'espèce a présenté, examiné en goutte pendante dans le milieu de RAULIN, les caractères morphologiques indiqués par GAYON et DUBOURG et par RABENHORST pour le *Mucor alternans* en ce qui concerne les appareils reproducteurs asexués.

2^o Caractères biologiques :

a) L'organisme pousse normalement sur les milieux usuels employés en mycologie; l'optimum cultural de température est situé entre $+ 25^{\circ}$ et $+ 27^{\circ}$; la concentration en ions H optima est au voisinage du $\text{pH} = 6,0$.

b) Action sur les hydrates de carbone :

L'espèce ensemencée sur un milieu purement minéral en présence de sels ammoniacaux comme source d'azote assimile le glucose et le maltose directement; le saccharose n'est pas interverti, il constitue, ainsi que le lactose, un mauvais aliment. La dextrine est saccharifiée et assimilée à l'état de maltose.

c) Action sur la cellulose :

Le champignon cultivé sur un milieu minéral ammoniacal en présence d'extrait de matières fécales assimile la cellulose en la transformant en cellobiose et en maltose. La vie en anaérobie exalte cette propriété.

2) *Mucor piriformis* Rabenhorst

Chez le même insecte (larve de *Sciapteron tabaniformis*) nous avons isolé un autre *Oomycète* de la famille des *Mucorinées* : après avoir repiqué cet organisme sur divers milieux employés en mycologie, nous avons effectué des cultures en goutte pendante, sur milieu de Raulin glucosé et nous avons suivi la culture aux différents stades de son développement ; microscopiquement nous avons mis en évidence les caractères suivants :

Mycélium non cloisonné peu ramifié ; les hyphes sporangifères sont dressées mais se trouvent déviées parfois pour donner un mycélium non compact : l'épaisseur des filaments mycéliens varie de 6 à 10 μ ; la hauteur des filaments peut atteindre 1 centimètre $\frac{1}{2}$ à 2 centimètres ; dans certains cas nous observons des ramifications latérales au nombre de 1 ou 2 ; elles sont quelquefois stériles ; dans certains cas elles portent des sporanges (1 par ramification) sans cloison (Pl. III, 4) ; la membrane est incolore et lisse de même que le contenu. Les hyphes fructifères ont une longueur qui peut aller jusqu'à 7 à 8 millimètres, leur largeur varie entre 2 et 4 μ . Les sporanges, au début de la culture, ont une teinte blanchâtre qui vers le septième jour passe au gris pour devenir finalement noirâtre ; leur diamètre varie entre 18 et 26 μ ; leur surface est hérissée de pointes ; la membrane est assez éphémère ; la columelle piriforme (Pl. III, 6) occupe une place importante relativement au sporange ; elle mesure de 14 à 22 μ de longueur et a une largeur de 9 à 18 μ à la partie supérieure et de 7 à 10 μ à la base. Les spores sont elliptiques, toutes semblables, mesurant dans leur longueur de 0 μ , 8 μ à 1 μ , 6 μ et 0 μ , 5 à 1 μ dans leur largeur ; leur membrane est lisse et incolore (Pl. III, 5).

Propriétés biologiques :

Optimum de croissance : La température optima de croissance pour l'organisme envisagé est située entre $+18^{\circ}$ et $+23^{\circ}$; pour les formes mycéliennes, elles n'apparaissent plus au-dessus de $+40^{\circ}$; les formes de souffrance résistent au delà de $+40^{\circ}$; la limite inférieure est située à $+10^{\circ}$.

Concentration en ions H des milieux de culture :

La détermination de la concentration optima en ions H a été effectuée sur milieu de RAULIN glucosé, milieu sur lequel l'organisme a donné la récolte maxima après 25 jours de culture ; cet optimum est situé au voisinage du pH 6,3.

Caractères morphologiques sur les différents milieux :

Les essais ont été effectués sur les milieux usuels utilisés en mycologie. Sur milieu glucosé, l'organisme présente une bonne croissance, le quatrième jour le mycélium s'étale à la surface du milieu de culture et le huitième jour on peut constater la formation des appareils reproducteurs qui prennent une teinte blanche fonçant avec l'âge; le dixième jour la culture est luxuriante. Les divers prélèvements effectués à divers stades de la culture, que nous avons examinés au microscope ne nous ont jamais montré des formes levures; sur milieu glucosé le champignon présente une poussée normale sans formation de souffrance aucune.

Sur milieu de RAULIN saccharosé notre organisme a pris des formes de souffrance caractérisées par des cellules sphériques en abondance; certaines se mettent à bourgeonner à la façon des levures; les formes mycéliennes sont extrêmement rares; quelques-unes sont visibles au début de la culture, mais au bout d'un certain temps relativement court, elles font complètement défaut. Sur ce substrat l'organisme ne forme pas de sporanges.

Nous avons poursuivi nos recherches en ensemençant le *Mucor* sur milieu de RAULIN maltosé et sur milieu de SABOURAUD maltosé; ici encore nous ferons les mêmes constatations déjà exprimées à propos des milieux saccharosés : absence de sporanges, disparition des formes mycéliennes, présence de nombreuses cellules sphériques et de formes bourgeonnantes.

Dans le milieu de RAULIN nous avons substitué aux divers hydrates de carbone déjà expérimentés de l'empois d'amidon; sur ce milieu, l'organisme a évolué très faiblement donnant des formes exclusivement mycéliennes; de rares sporanges se sont formés; la culture ne s'est pas étendue; ce substrat ne favorise aucunement la croissance et ne constitue pas un aliment suffisant.

Sur milieu lactosé la croissance a été plus satisfaisante sans être luxuriante, l'évolution a été lente; cet hydrate de carbone ne semble pas, lui non plus, être intéressant pour notre organisme. Sur milieu lévulosé, croissance très faible elle aussi.

Milieux azotés :

Nous avons utilisé le milieu nitraté déjà décrit par nous précédemment et nous y avons introduit comme hydrate de carbone le saccharose. La poussée a débuté au bout de huit jours; elle a été extrêmement lente et faible; les chlamydo-spores et les formes levures y sont en majorité; ce milieu ne permet pas l'évolution normale de notre champignon.

Sur milieu ammoniacal, en présence de saccharose ou de maltose, la croissance se produit très rapidement; les divers prélèvements effectués à différents stades de culture nous ont toujours permis de constater un mycélium normal donnant naissance à des hyphes fructifères; de nombreux sporanges sont présents dans la culture; en même temps que des formes levures et des chlamydospores dans les prélèvements effectués dans les parties immergées.

Ainsi donc cet organisme n'utilise pas l'azote alimentaire qui lui est fourni sous forme de nitrates; au contraire il paraît tirer un excellent parti de l'azote tiré d'aliments ammoniacaux, pour sa constitution plastique cellulaire.

Le lait est coagulé au bout de six jours et une redissolution du magma formé est obtenue le dixième jour; il y a donc sécrétion d'une présure et d'une caséase.

Les peptones en présence de saccharose nous ont donné d'excellents résultats et ils semblent constituer les meilleurs milieux de culture pour l'espèce envisagée.

De tous ces caractères morphologiques et biologiques nous pouvons conclure que l'organisme isolé est le *Mucor piriformis*, RABENHORST (61).

*Action assimilatrice du Mucor piriformis vis-à-vis de
divers hydrates de carbone :*

Dans ces recherches, nous avons utilisé le même milieu ammoniacal auquel nous avons ajouté respectivement des quantités de sucre différentes suivant l'hydrate de carbone envisagé. Le mode opératoire a été le même que celui utilisé par nous antérieurement. Dans chaque expérience des témoins non ensemencés ont été soumis aux mêmes conditions que les milieux ensemencés. Après vérification de la non-réduction de la liqueur de FEHLING par les solutions, on a pratiqué l'interversion puis le dosage du sucre réducteur. Les résultats nous ont toujours donné des quantités correspondantes au saccharose introduit, en ce qui concerne le milieu contenant ce sucre.

Dans le milieu au saccharose le procédé de BERTRAND nous a permis de constater par la culture, une disparition assez rapide de ce sucre et sa transformation en sucre réducteur; nos résultats chimiques ont été vérifiés au moyen du procédé polarimétrique. Le tableau qui suit exprime la moyenne des résultats obtenus :

Age	Sucre introduit	Sucre restant	Sucre disparu
1 ^{er} jour	5 gr.	5 gr	—
10 ^e jour	5 gr.	3,80 gr.	1,20 gr.
20 ^e jour	5 gr.	2,15 gr.	2,85 gr.
30 ^e jour	5 gr.	0,74 gr.	4,26 gr.

Les résultats précédents montrent qu'une quantité de saccharose élevée a disparu du milieu : notre substrat vierge n'a en aucun cas réduit la liqueur de FEHLING et sur les milieux ensemencés nous avons constaté une réduction appréciable déjà après le premier jour de culture.

Pour nous rendre compte du phénomène et parce que nous avions, au cours de l'évolution des cultures sur le milieu saccharosé, constaté la formation de bulles gazeuses, nous résolûmes de rechercher l'alcool dans nos différents milieux ; dans le tableau qui suit nous exprimons les résultats trouvés :

	<i>Alcool % du milieu</i>
10 ^e jour de culture	0
20 ^e » »	0 gr. 46
30 ^e » »	1 gr. 20

Ces résultats prouvent que l'hydrolyse du saccharose par le *Mucor piriformis* aboutit à la formation de petites quantités d'alcool.

L'organisme hydrolyse donc le saccharose mis à sa disposition, l'assimile après transformation en glucose. Une petite quantité de ce glucose est transformée en alcool ; l'organisme est capable de continuer à vivre sur ce milieu très faiblement alcoolisé.

Les mêmes expériences ont été faites en anaérobiose : disons tout d'abord que sur ce milieu et dans ces conditions l'organisme ne produit pas de formes mycéliennes, mais donne des formes de souffrance et une grande quantité de cellules en levure et bourgeonnantes. Dans les tableaux qui suivent nous exprimons le saccharose disparu et l'alcool présent dans le milieu de culture aux différentes périodes :

I)	<i>Saccharose présent :</i>	<i>Saccharose disparu :</i>
Milieux témoins	5 gr. %	
<i>Milieux ensemencés :</i>		
10 ^e jour de culture	3 gr. 38	1 gr. 72
20 ^e » »	1 gr. 73	3 gr. 27
30 ^e » »	0 gr. 68	4 gr. 32

II)	<i>Alcool % du milieu</i>
<i>Milieux témoins :</i>	
<i>Milieux ensemencés :</i>	
10 ^e jour de culture	0 gr. 32
20 ^e » »	1 gr. 24
30 ^e » »	2 gr. 07

Ces résultats expriment que la disparition du saccharose est plus importante en anaérobiose qu'en aérobiose ; l'alcool formé est

aussi augmenté par la vie anaérobie. L'organisme, *dans ce cas exalte ses propriétés* de former des diastases hydrolysantes vis-à-vis du saccharose; de même la sécrétion de zymase est plus élevée.

Des expériences semblables ont été poursuivies suivant un processus identique en remplaçant dans notre milieu ammoniacal le saccharose par le maltose; les tableaux suivants donnent nos constatations à cet égard :

a) *Vie aérobie :*

I.		Maltose présent :	Maltose disparu :
Milieux témoins :	5 gr. %		0
<i>Milieux ensemenés :</i>			
10 ^e jour de culture	3 gr. 48		1 gr. 52
20 ^e » »	2 gr. 47		2 gr. 53
30 ^e » »	1 gr. 19		3 gr. 81
II.		<i>Alcool % du milieu</i>	
Milieux témoins		0	
<i>Milieux ensemenés :</i>			
10 ^e jour de culture		0	
20 ^e » »		0 gr. 2	
30 ^e » »		0 gr. 8	

b) *Vie anaérobie :*

I.		<i>Maltose présent : Maltose disparu :</i>	
Milieux témoins	5 %		0
<i>Milieux ensemenés :</i>			
10 ^e jour de culture	3 gr. 24		1 gr. 76
20 ^e » »	2 gr. 08		2 gr. 92
30 ^e » »	1 gr.		4 gr.
II.		<i>Alcool % du milieu :</i>	
Milieux témoins		0	
<i>Milieux ensemenés :</i>			
10 ^e jour de culture		0 gr. 27	
20 ^e » »		0 gr. 65	
30 ^e » »		1 gr. 49	

Nous voyons par ces chiffres que le *Mucor piriformis* est capable en aérobie d'hydrolyser le maltose qui lui est offert en milieu ammoniacal; l'intensité de cette transformation est à peu près équivalente à celle que le même organisme réalise en partant du saccharose, de même que les quantités d'alcool produites.

Dans la vie anaérobie nous constatons ici aussi une exaltation dans le pouvoir hydrolysant et dans la fermentation alcoolique.

Il nous a paru intéressant de rechercher le stade intermédiaire dans cette décomposition du maltose, compris entre ce sucre lui-même et l'alcool obtenu par fermentation: c'est pourquoi, encore une fois nous avons essayé de séparer le pouvoir hydrolysant du pouvoir fermentatif et ceci par addition de xylol. Ici encore le mycélium a été plasmolysé dans le milieu de culture au moyen d'une solution concentrée de phosphate trisodique parfaitement neutre; on a laissé en contact pendant quatre heures puis nous avons ajouté du xylol afin d'arrêter l'action fermentative; nous avons abandonné à l'étuve à $+ 37^{\circ}$ huit jours; on a filtré, et le filtrat a servi à la caractérisation des produits formés. Pour ceci nous nous sommes adressé à la réaction des osazones.

Nous avons obtenu un mélange de cristaux dont une partie ne s'est pas dissoute dans l'eau, l'autre partie a montré une solubilité: nous avons ainsi séparé les constituants de notre mélange. La première partie nous a fourni les caractères suivants :

Solubilité dans l'eau	Insoluble
Solubilité dans l'alcool	Positive
Point de fusion	$+ 235^{\circ}$

Les caractères microscopiques ont été les suivants : cristaux en aiguilles fines groupées en faisceaux convergents. Nous avons ainsi pu voir que nous avions affaire à la glucosazone.

La deuxième partie offrait les propriétés suivantes :

Solubilité dans l'eau	Positive
Solubilité dans l'alcool	Positive
Point de fusion	$+ 211^{\circ}$

Par l'examen microscopique nous avons mis en évidence des cristaux offrant l'aspect de la maltosazone.

Le *Mucor piriformis* attaque donc le saccharosé et le maltose pour l'hydrolyser et donner du glucose qui est directement assimilable; il en transforme par fermentation une petite quantité en alcool.

Action du Mucor piriformis sur la cellulose :

Ces recherches ont été effectuées sur milieu cellulose-matières fécales en aérobie et en anaérobie. L'organisme évolue très lentement dans les premiers jours de culture; il ne se forme pas de mycélium ni d'appareils reproducteurs; les divers prélèvements effectués nous ont montré en majorité des chlamydo-spores. Le dixième jour la croissance est complètement arrêtée.

Ayant introduit dans nos milieux des quantités rigoureusement pesées de cellulose, nous avons procédé après 20, 30, 50 jours et 3 mois à des dosages de cellulose; dans le tableau suivant on verra les résultats obtenus :

	Cellulose introduite :	Cellulose restante :
Après 20 jours de culture ..	1 gr.	1 gr.
» 30 » ..	1 gr.	1 gr.
» 50 » ..	1 gr.	0 gr. 975
» 3 mois ..	1 gr.	0 gr. 983

On voit donc par ces résultats que le *Mucor piriformis* n'a pas hydrolysé la cellulose et ne s'en est pas servi pour ses besoins alimentaires; il a utilisé de petites quantités d'azote présentes dans le milieu au début de la culture; après quelques jours l'alcalinisation a été complète et ne lui a plus permis d'évolution.

Toutes ces expériences montrent que le *Mucor piriformis* est capable de dégrader le saccharose et le maltose en glucose assimilable qu'il utilise; une petite partie de ce glucose est transformée par le champignon en alcool. Ces propriétés sont exaltées par la vie anaérobie. Le *Mucor piriformis* est sans action sur la cellulose.

3) *Fusarium metachroum* APPEL et WOLLENWEBER.

Nous avons isolé cet organisme de l'intestin de larves de *Sciapteron tabaniformis* ROTT. Après avoir pratiqué les méthodes de séparation par lavage que nous avons décrites dans le chapitre des méthodes générales, nous avons cultivé le champignon sur différents milieux pour fixer l'espèce; nous avons employé à cet effet des cultures sur différents substrats végétaux tels que tubercules et tiges de pomme de terre, tiges de haricot; plus tard nous nous sommes adressé au milieu de SABOURAUD maltosé et au milieu minéral peptoné maltosé, décrit précédemment; les cultures en cellule ont été exécutées sur ces substrats.

En ce qui concerne les ensemencements effectués sur les coupes de tiges, nous avons constaté les caractères suivants : Le mycélium est cylindrique, cloisonné irrégulièrement, ramifié; les filaments mycéliens qui, bientôt après l'ensemencement, envahissent, l'épiderme et les couches profondes, se gonflent en certains endroits, prennent un aspect boudiné, (Pl. II, 9) ces formations grandissent et se réunissent en amas globuleux qui font éclater l'épiderme: il y a alors formation d'hyphes conidifères; le point d'insertion du support est constitué par une cellule assez volumineuse, à membrane épaisse qui présente une certaine ressemblance avec une chlamydospore; ces appareils portant les conidies prennent un aspect dense et compact (Pl. II, 5).

Les cultures en goutte pendante sur milieu minéral peptoné maltosé nous ont, par contre, donné les formations suivantes : le mycélium est cylindrique, cloisonné, irrégulièrement ramifié avec des anastomoses entre les filaments voisins; le protoplasme est hyalin, la membrane est lisse; l'épaisseur des filaments est très variable : 2 à 7 μ . Les appareils conidiophores sont formés très souvent terminalement sur une hyphe issue de la germination d'une conidie; ils sont insérés très rarement directement sur la conidie qui germe. Les rameaux fructifères sont souvent insérés irrégulièrement; ils peuvent rester simples ou se ramifier; sur ces rameaux se forment latéralement des rameaux secondaires (Pl. II, 2) qui portent le plus souvent 2 ou 3 stérigmates. Ces appareils fructifères sont étagés à des hauteurs différentes, en verticilles de 2 à 4 éléments ou plus. Les conidies se forment normalement soit à l'extrémité des stérigmates insérés sur les appareils fructifères compacts décrits plus haut ou par bourgeonnements latéraux des filaments, allongement de ces éléments (Pl. II, 8), cloisonnement à la base et dans la conidie, puis séparation.

Un autre mode de fructification a pu être observé par nous; certaines conidies naissent d'un tubercule rameux inséré sur l'hyphe primaire; elles sont très minces et toujours au nombre de trois ou de cinq. Elles se forment par différenciation de bourgeonnements provenant de rameaux du tubercule. Elles sont produites à répétition et sont réunies souvent en masses capitulaires globuleuses simulant un sporange, par une sorte de gelée; dans ce dernier processus elles sont séparées de l'hyphe fructifère avant de se cloisonner et elles se cloisonnent par la suite; dans la plupart des cas elles possèdent cinq cloisons; sur milieu très favorable nous en avons rencontré un assez grand nombre présentant six cloisons; par contre sur des milieux pauvres on remarque trois ou quatre cloisons par conidie. Leur forme est typique (Pl. II, 1) et très constante : en fuseau très allongé, peu courbé; les extrémités sont un peu infléchies et surtout l'extrémité supérieure; à la base la conidie se termine par une légère invagination au point d'insertion mais ce fait est peu perceptible. Les extrémités ne se terminent pas en pointes aiguës, mais sont un peu émoussées; les cloisons sont souvent très peu marquées; on peut toutefois les observer avec facilité sous l'objectif à immersion en diaphragmant quelque peu. Dans chaque cellule, nous avons noté la présence d'un noyau; les vacuoles sont très rares. Les conidies cinq-septées ont une longueur qui varie suivant l'âge de la culture de 48 à 52 μ ; leur épaisseur est comprise entre 3 μ , 5 et 4, 5 μ . Les conidies six-septées sont plus longues et peuvent atteindre jusqu'à 60 μ sur 4 μ , 50.

Nous avons observé très rarement des chlamydospores sphériques à protoplasme granuleux, à membrane épaisse.

Sur les milieux le mycélium aérien est blanc ou légèrement rosé; le stroma apparaît d'abord blanc, devient jaunâtre et passe finalement au rouge carmin; avec l'âge on peut obtenir des teintes allant jusqu'au rouge brun.

Sur les milieux solides, les hyphes qui donnent naissance aux conidies sont très longues et grêles; au contraire sur les milieux liquides ces éléments restent très courts; en aucun cas nous n'avons pu observer de sclérote.

Optimum de croissance : L'optimum de croissance est situé aux environs de $+ 28^{\circ}$.

Concentration optima en ions H des milieux de culture : Le maximum de récolte nous a été donné par les pH voisins de 6,3.

Aspect et croissance sur différents milieux : Sur milieu de pomme de terre le troisième jour nous constatons un début de culture; cinq jours après l'ensemencement la pomme de terre est envahie par le mycélium, d'abord d'un blanc très légèrement rosé et qui passe plus tard au rose franc puis au rouge cerise, lorsque la culture est âgée.

Sur milieu riz-lait la culture se manifeste par une croissance plus rapide que sur le milieu précédent; le mycélium pousse en surface et dans la profondeur du milieu; ici aussi nous avons observé le changement de couleur du blanc rose au rose franc, mais avec moins d'intensité que sur le milieu précédent. Sur le milieu de SABOURAUD maltosé la croissance est très bonne.

Le milieu ammoniacal semble un substrat défavorable au bon développement de l'organisme qui devient très chétif. Par contre l'addition à ce milieu d'une petite quantité d'extrait de matières fécales est très favorable; le troisième jour une couche rosée envahit le milieu; l'examen microscopique nous a montré un grand nombre d'appareils fructifères portant des conidies en verticilles réguliers et de tubercules rameux conidifères condensés.

Action sur la cellulose :

Dans nos recherches de l'action sur la cellulose, nous avons employé le milieu qui nous avait donné de bons résultats à propos de quelques *Fusarium*. Le champignon s'étale sur le rectangle de cellulose en donnant un revêtement blanc rosé, la croissance est très bonne; l'examen microscopique des prélèvements effectués dans les milieux le dixième jour après l'ensemencement nous montre un nombre considérable de conidies; après un mois la cellulose est passée de la couleur blanche au jaune orangé, et par agitation elle se désagrège en certaines de ses parties.

Voulant nous rendre compte de l'influence de l'aliment azoté sur la destruction de la cellulose, nous avons été amené à faire les expériences suivantes :

Dans le même milieu privé de matières azotées, nous avons ajouté, dans chacune de nos recherches, une substance quaternaire différente, nous avons ensemencé notre organisme sur ces différents milieux, on a laissé cultiver 130 jours; au bout de ce temps les dosages de cellulose ont été effectués; les substances azotées ajoutées ont été : nitrate de potassium, sulfate d'ammoniaque, nitrate d'ammoniaque, asparagine, peptones. Les résultats suivants ont été observés :

Température du Laboratoire

Source d'Azote	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o Nitrate de potassium	1 gr.	0,573	0,427	42,7
2 ^o » » »	1 gr.	0,535	0,465	46,5
3 ^o Sulfate d'ammoniaque	1 gr.	0,668	0,332	33,2
4 ^o » » »	1 gr.	0,792	0,208	20,8
5 ^o Nitrate d'ammoniaque	1 gr.	0,414	0,586	58,6
6 ^o » » »	1 gr.	0,565	0,435	43,5
7 ^o Asparagine	1 gr.	0,388	0,612	61,2
8 ^o »	1 gr.	0,351	0,349	34,9
9 ^o Peptones	1 gr.	0,277	0,723	72,3
10 ^o »	1 gr.	0,242	0,758	75,8

Température : + 27^o

1 ^o Nitrate de potassium	1 gr.	0,521	0,479	47,9
2 ^o » » »	1 gr.	0,477	0,529	52,9
3 ^o Sulfate d'ammoniaque	1 gr.	0,625	0,375	37,5
4 ^o » » »	1 gr.	0,678	0,322	32,2
5 ^o Nitrate d'ammoniaque	1 gr.	0,360	0,640	64,0
6 ^o » » »	1 gr.	0,322	0,678	67,8
7 ^o Asparagine	1 gr.	0,281	0,719	71,9
8 ^o »	1 gr.	0,308	0,692	69,2
9 ^o Peptone	1 gr.	0,210	0,790	79,0
10 ^o »	1 gr.	0,267	0,733	73,3

Les tableaux précédents montrent que les milieux les plus favorables à l'attaque de la cellulose par notre organisme sont ceux dans lesquels on a fait entrer comme sources d'azote la peptone (milieu organique) et le nitrate d'ammoniaque (milieu minéral).

La température de +27^o est nettement plus favorable à l'attaque de la cellulose que la température du Laboratoire.

Nous avons voulu nous rendre compte de l'influence d'une petite quantité d'extrait de matières fécales sur la dégradation

de la cellulose et nous avons employé pour cela le milieu initial + nitrate d'ammoniaque d'un côté, le milieu initial + peptones de l'autre :

Milieu initial + nitrate d'ammoniaque + extrait de matières fécales

Température : +27°.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours	1 gr.	0,423	0,577	57,7
2 ^o	98 »	1 gr.	0,352	0,648	64,8
3 ^o	115 »	1 gr.	0,325	0,675	67,5
4 ^o	127 »	1 gr.	0,266	0,734	73,4

Milieu initial + peptones + extrait de matières fécales

Température : +27°.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours	1 gr.	0,409	0,591	59,1
2 ^o	98 »	1 gr.	0,346	0,654	65,4
3 ^o	115 »	1 gr.	0,283	0,717	71,7
4 ^o	127 »	1 gr.	0,278	0,722	72,2

Ainsi donc, on voit que l'extrait de matières fécales a une action très favorable sur la dégradation de la cellulose par le *Fusarium* en expérience en présence de nitrate d'ammoniaque. Ce milieu se rapproche du milieu peptoné.

Vie anaérobie

Nous avons répété ces expériences en anaérobie :

Milieu initial + extrait de matières fécales + nitrate d'ammoniaque.

Température du Laboratoire + 27°.

	Age de la culture	Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours	1 gr.	0,664	0,339	33,9
2 ^o	98 »	1 gr.	0,610	0,390	39,0
3 ^o	115 »	1 gr.	0,517	0,483	48,3
4 ^o	127 »	1 gr.	0,524	0,476	47,6

Même milieu.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,630	0,370	37,0
2 ^o	98 »		1 gr.	0,558	0,442	44,2
3 ^o	115 »		1 gr.	0,492	0,508	50,8
4 ^o	127 »		1 gr.	0,437	0,563	56,3

Température du Laboratoire.

Milieu initial + extrait de matières fécales + peptones

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,554	0,446	44,6
2 ^o	98 »		1 gr.	0,479	0,523	52,3
3 ^o	115 »		1 gr.	0,426	0,574	57,4
4 ^o	127 »		1 gr.	0,411	0,589	58,9

Même milieu.

Température : +27°.

	Age de la culture		Cellulose introduite	Cellulose restante	Cellulose disparue	Cellulose disparue %
1 ^o	87 jours		1 gr.	0,535	0,465	46,5
2 ^o	98 »		1 gr.	0,497	0,503	50,3
3 ^o	115 »		1 gr.	0,374	0,626	62,6
4 ^o	127 »		1 gr.	0,360	0,640	64,0

L'organisme étudié est donc capable d'attaquer la cellulose ; les milieux où se manifeste le maximum d'intensité dans cette action sont ceux qui contiennent une petite quantité d'extrait de matières fécales et soit 1 % de nitrate d'ammoniaque, soit 1 % de peptones ; toutefois les peptones semblent exercer une action nettement plus favorable quant à la dégradation du polysaccharide que le nitrate d'ammoniaque.

La vie en anaérobie diminue notablement l'action dégradatrice du champignon vis-à-vis de la cellulose.

Ici encore à la température de +27° la disparition de la cellulose est plus élevée qu'à la température du Laboratoire.

Le *Fusarium* en expérience est donc capable comme le précédent de dégrader la cellulose, mais en ce qui le concerne, son action est quantitativement moins grande que celle produite par le *Fusarium* précédent.

L'organisme isolé du tube digestif de *Sciapteron tabaniformis* Rott. a été comparé aux fins de classification à des espèces que le Laboratoire de Baarn a bien voulu mettre à notre disposition : *Fusarium orthoceras*, *Fusarium Lolii*, *Fusarium subulatum*.

Nous avons ainsi pu constater que notre espèce se rapprocherait morphologiquement aussi bien macroscopiquement que microscopiquement du *Fusarium subulatum* Appel et Wollenweber (3) ; d'autre part, après avoir étudié les caractères biologiques et ayant ainsi constaté que notre organisme attaque la cellulose en proportions assez élevées, nous avons été contraints d'orienter notre diagnose dans un autre sens car le *Fusarium subulatum*, d'après le travail de HELLER (28) ne possède pas de pouvoir cellulolytique élevé ; c'est alors que nous avons eu recours au magistral travail d'APPEL et WOLLENWEBER (3) que ce dernier nous a indiqué fort aimablement et nous avons ainsi pu constater que notre espèce se rapproche beaucoup de *Fusarium metachroum* APPEL et WOLLENWEBER qui, d'après HELLER dégrade la cellulose à un degré élevé. Notre organisme ne s'éloigne morphologiquement de *Fusarium subulatum* que très peu (dimension des conidies, croissance du mycélium).

Pour toutes ces raisons nous ne croyons pas devoir en faire une espèce nouvelle.

CHAPITRE V

Microorganismes cellulophages isolés de *Cerambyx scopolii* Füssl.

- I) *Willia Saturnus* Klöcker var. *cerambycida*
 - II) *Bacillus cellulosae cerambycidus* n. sp.
-

CHAPITRE V

Microorganismes cellulophages isolés de *Cerambyx scopolii* Füssl

1) *Willia saturnus* Klöcker, var. *cerambycida*.

Les larves que nous avons stérilisées et sacrifiées suivant nos techniques habituelles ont été débarrassées de leur tube digestif dans la chambre stérile; des ensemencements ont été pratiqués sur différents milieux; nous avons pu isoler une levure que nous avons cultivé sur liquide de RAULIN glucosé et sur milieu cellulose-matières fécales; ayant vérifié la pureté de notre organisme nous avons pratiqué des cultures en goutte pendante.

L'examen microscopique nous a donné les caractères microscopiques suivants : Forme ovale, contours lisses : de 3 à 6 μ . de long sur 2 à 4 μ . de large (Pl. III, 7); le bourgeonnement s'effectue à la manière d'un *Saccharomyces*. Certains éléments sont entourés d'un anneau médian qui leur donne un peu l'aspect de la planète de Saturne. On a pu suivre l'évolution de ces éléments; tout d'abord l'anneau médian émigre vers un bord, où il donne l'aspect d'un épaississement de la membrane; la cellule grandit alors et du côté opposé elle bourgeonne pour donner une cellule-fille, celle-ci se sépare après 3 ou 4 heures; elle évolue alors et donne des formes levures ovales.

Etude biologique : Nous avons effectué des cultures sur des milieux liquides et solides afin de rechercher l'action sur les hydrates de carbone et sur les matières quaternaires. Disons tout d'abord que la levure se développe bien sur milieu de pomme de terre acide ou de carotte; le milieu jus de pomme de terre glycérimé gélosé constitue un substrat de choix : en deux jours les colonies envahissent la moitié du milieu; celles-ci sont blanches ou d'un blanc grisâtre, mates avec une surélévation en forme de disque au centre. Le glucose ajouté au liquide de RAULIN permet une belle luxuriance du champignon; nous assistons à une fermentation très lente qui est facilement contrôlable par la méthode de LINDNER (42) dans la chambre humide.

Le glucose est ainsi transformé en alcool. Ensemencée sur milieu saccharosé et sur milieu maltosé, la levure se développe lentement; il n'y a aucune production d'invertine ni de maltase. Les formes trouvées au fond de ces milieux (Pl. III, 8) étaient arrondies et réunies en chapelets. De même le lactose et le lévulose ne sont pas attaqués.

Sur milieu à base de peptones ou de nitrate de potassium additionné de glucose ou de saccharose, le développement est bon, le milieu se trouble bientôt et il se forme un abondant dépôt au fond du vase de culture. Si on effectue des cultures dans les mêmes conditions en ajoutant seulement des traces faibles de nitrates ou en remplaçant ces sels azotés par de l'extrait de matières fécales, on constate que le dépôt perceptible dans les expériences antérieures ne se forme plus, le milieu ne se trouble pas et la poussée de l'organisme a lieu en surface par un voile épais.

Ensemencé sur milieux spécifiques à base de cellulose-matières fécales, l'organisme n'a guère poussé et, en aucun cas, ni en aérobie, ni en anaérobie, nous n'avons pu constater une attaque de la cellulose.

D'après l'examen microscopique et l'étude biologique de cette levure et nous référant aux travaux de HANSEN, KLÖCKER, GUILLERMOND, nous rapportons l'espèce envisagée au genre *Willia* HANSEN; nous proposons de l'appeler *Willia saturnus* KLÖCKER, variété *cerambycida*.

2) *Bacillus cellulosae cerambycidus*.

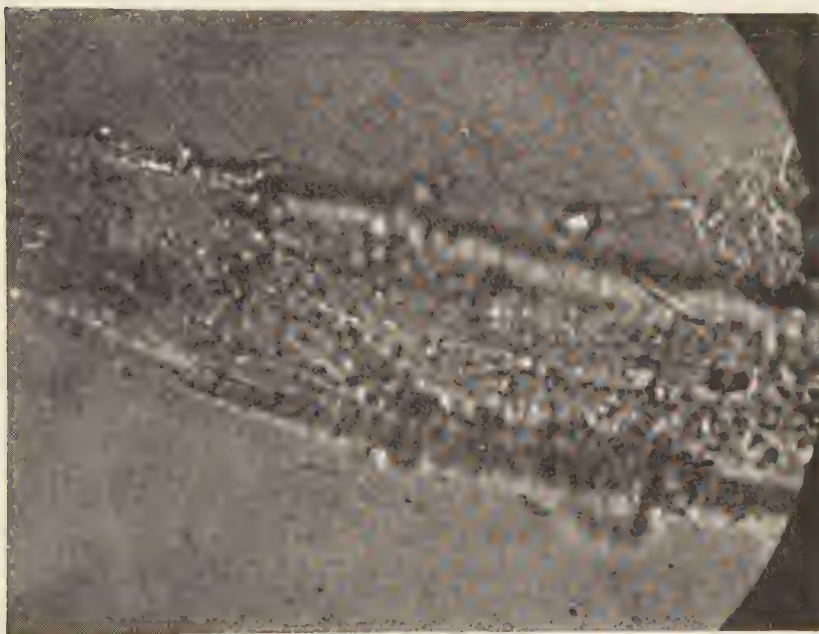
Isolement

Nous avons utilisé le milieu cellulosé alcalin à l'extrait de matières fécales décrit par Mme KHOUVINE-DELAUNAY (36), contenant du carbonate de calcium. Nous avons préféré, de façon à éviter une perte d'azote par la stérilisation à l'autoclave, perte due à l'action du carbonate de calcium, opérer de la façon suivante : nous avons stérilisé à l'autoclave à la température de 120° pendant 20 minutes, le milieu privé de carbonate de calcium ; celui-ci a été passé à l'étuve à +160° — +170° pendant une heure. La cellulose a été stérilisée chaque fois dans le milieu et après ces opérations nous avons, en prenant toutes les précautions nécessaires, introduit la craie dans le milieu. L'ensemencement a été pratiqué au moyen de divers prélèvements effectués dans l'intestin des larves ; une certaine quantité de culture a été soumise à l'aérobiose, d'autres ont été maintenues en anaérobiose. Les cultures aérobies ne nous ont donné que des germes n'ayant aucun pouvoir d'attaque sur la cellulose. Pour éviter toute perte d'azote nous n'avons pas fait bouillir les milieux

de façon à chasser l'air : nous avons préféré prolonger l'action du vide par la trompe à eau pendant 2 heures pour chaque tube de culture.

Les tubes employés sont des tubes de *Roux* modifiés (Fig. 5). Nous avons fait arriver le niveau du milieu jusqu'au $\frac{1}{3}$ inférieur. Après ensemencement et privation d'air ils ont été fermés (scellés) à la trompe à eau ; le vide était à ce moment de 6 à 8 centimètres de mercure.

Nous avons porté à l'étuve à $+38^{\circ}$ et tous les jours nous avons



(Fig. 13)

Fibre de cellulose attaquée par le *Bacillus cellulose cerambycidus* n. sp.,

agité ces tubes afin de remuer la couche de craie déposée et de permettre son action neutralisante. Quinze jours après on pouvait constater dans les parties profondes de la culture une pigmentation de la cellulose en jaune : c'est alors que nous avons pratiqué la méthode d'enrichissement de *VAN HIRSON* (34). Dès l'apparition de la teinte jaune sur la cellulose nous avons repiqué les parties de cellulose pigmentées et c'est ainsi que nous avons pu réussir nos repiquages. Nous avons continué l'enrichissement et par ce procédé nous avons pu observer que dans certains tubes toute la surface de la cellulose se colorait en jaune : presque toujours cette coloration a pris naissance au fond du tube pour remonter lentement vers le haut ;

quelquefois la coloration se limitait à une ou deux localisations dans le fond du tube. Au commencement de la croissance nous avons pu observer un faible dégagement gazeux ; la cellulose ne fait pas l'impression d'être défibrée, mais les différents morceaux attaqués donnent l'impression d'être amincis progressivement jusqu'à donner l'aspect de fines pellicules. Notons ici qu'à ce stade le dégagement gazeux a cessé complètement. En repiquant ces cultures nous avons obtenu des formes bactériennes donnant une pigmentation jaune à la cellulose qu'elles attaquaient et des formes attaquant le polysaccharide sans donner de pigmentation. Pour arriver au stade pellicule, dont nous avons parlé plus haut, il nous a fallu environ 6 à 8 semaines. Les tentatives que nous avons faites pour obtenir des cultures, en repiquant non plus des particules de cellulose attaquée, mais seulement des gouttes de liquide de cultures, sont toutes restées vaines.

Examen microscopique

Entre lame et lamelle : bacilles immobiles.

Par simple coloration, bacille en forme de bâtonnet presque toujours droit ou légèrement incurvé. Dimensions : longueur 2 à 5 μ . sur $\frac{1}{3}$ μ . d'épaisseur. Ces éléments sont souvent groupés par deux ou par trois de façon à former une petite chaîne. Les prélèvements effectués sur la cellulose même et surtout dans la profondeur des tubes présentent des bâtonnets renfermant 2 spores endogènes et nous remarquons des chaînes de 2 à 4 bâtonnets qui par désagrégation libèrent une petite file de spores ovoïdes. Les spores complètement isolées du corps bactérien restent groupées par 2, donnant des éléments assez grands (1 à 2 μ). Elles ont un aspect très caractéristique et nous nous permettons de rappeler ici les formes spéciales obtenues chez les *Mucors* par adaptation à la cellulose.

Colorations

Les colorants d'aniline colorent les différents éléments d'une façon très satisfaisante ; l'iode colore cette bactérie en bleu.

Les bâtonnets se décolorent par la méthode de GRAM alors que les spores restent électivement colorées.

Par les méthodes de NICOLLE et de VAN ERMINGEN nous avons réussi à mettre en évidence des cils situés aux pôles des bâtonnets ; à chaque pôle ils sont au nombre de 1 ou de 2. Sur la cellulose nous avons nettement mis en évidence et surtout par la méthode de GRAM des spores qui se réunissent en gaines autour des fibres cellulosiques et les dégradent complètement ; ces spores restent en amas en épousant la forme de la fibre détruite.

Repiquées en aérobiose sur milieux celluloses elles ont donné des formes en bâtonnets, mais ici les spores caractérisées sur cellulose en anaérobiose n'ont pas apparu ; la coloration jaune a toujours fait défaut.

Influence de la température

Les températures optima de culture sont comprises entre $+ 32^{\circ}$ et $+ 38^{\circ}$. En ce qui concerne l'influence sur la dégradation cellulosique et la formation des spores caractéristiques, nous avons pu constater qu'à $+ 38^{\circ}$ l'action sur la cellulose débutait au bout de 15 jours. A $+ 40^{\circ}$ et entre $+ 40^{\circ}$ et $+ 45^{\circ}$ l'attaque du polysaccharide était déjà constatable vers le cinquième jour ; ceci semble correspondre à la résistance extrême des spores et aux propriétés cellulophages de ces éléments.

Concentration optima en ions H

Pour le bâtonnet que nous avons pu obtenir en aérobiose, nous avons obtenu le maximum de récolte pour un pH du milieu de culture compris entre pH : 7,9 et pH : 8,1.

En anaérobiose le fait a été très difficile à vérifier ; l'optimum semble réalisé pour un pH de départ compris entre 7,2 et 7,5. Au moment du terme final de la digestion, à l'ouverture des tubes le pH était situé aux environs de 9,3.

Action sur les hydrates de carbone

Nous avons constaté une poussée luxuriante de la bactérie sur milieu cellulose — matières fécales — peptone pancréatique (KHOUVINE (36)) et l'attaque de la cellulose a été très forte en anaérobiose.

Sur même milieu en aérobie, nous avons obtenu les formes bactériennes en bâtonnets ; sur ce milieu et dans ces conditions l'attaque de la cellulose s'est montrée nulle. Nous avons donc affaire à une bactérie anaérobie facultative, attaquant la cellulose seulement en anaérobiose ; après avoir vérifié ces faits, et constaté la croissance en aérobie (en ceci comme dans le mode de formation des spores notre bactérie se distingue de la bactérie isolée par Madame KHOUVINE-DELAUNAY) (36) nous avons voulu voir comment notre organisme se conduisait vis-à-vis d'autres hydrates de carbone. Nous avons donc, dans le milieu précédent, remplacé la cellulose par ces corps. Des solutions d'hydrates de carbone concentrées ont été préparées et, pour ne pas apporter de modifications dans leur composition, on les a tyndalisé pour les sucres réducteurs ; des dosages suivant la méthode de BERTRAND ont permis de déterminer

exactement leur titre ; on les a introduit dans notre milieu stérilisé. On a laissé 4 jours à l'étuve pour contrôler la stérilité de ces milieux et nous avonsensemencé largement au moyen de notre bactérie prélevée dans une culture où elle était en pleine action dégradatrice. Les sucres essayés ont été les suivants :

Pentoses : Arabinose.

Hexoses : Glucose, levulose.

Bioses : Saccharose, maltose, lactose, cellobiose.

De plus on a étudié l'action de la bactérie sur la glycérine et sur l'amidon. Malgré de larges ensemencements au moyen de cultures traitées par le procédé d'enrichissement, cultures en pleine activité dégradatrice vis-à-vis de la cellulose, nous n'avons obtenu aucune poussée de microorganismes, ni en aérobiose ni en anaérobiose.

Action sur les hydrates de carbone en présence de cellulose

Suivant la même technique que précédemment, nous avons mis la bactérie en présence d'un milieu renfermant à la fois de la cellulose et un autre hydrate de carbone. Ces cultures ont été placées à +40° et en anaérobie ; la bactérie a poussé, attaquant la cellulose en lui donnant la coloration jaune caractéristique. En comparaison avec des cultures témoins effectuées sur des milieux sans hydrates de carbone, nous avons pu constater que l'apparition des taches jaunes et leur étalement se faisait plus vite ; ceci nous prouve que l'évolution et la multiplication de la bactérie s'effectuaient plus rapidement ; par contre la disparition de la cellulose était dans ces cultures retardée de 8 à 16 jours.

Dans le milieu où nous avons ajouté du glucose, nous avons dosé sur divers échantillons prélevés avant la culture et après ensemencement, au moment où la dégradation de la cellulose nous semblait la plus active, le sucre réducteur au moyen de la méthode de BERTRAND et nous avons pu constater dans ces dosages qu'une partie du glucose avait disparu.

De ces expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

L'organisme est incapable d'assimiler des hydrates de carbone de constitution simple mais, mise en présence de cellulose, la bactérie excitée spécifiquement par le polysaccharide est capable d'engendrer des diastases lui permettant d'employer pour ses besoins énergétiques ces sources de carbone.

Cette constatation éloigne notre bactérie du *Bacillus cellulosaedissolvens* qui d'après Madame KHOUVINE-DELAUNAY (36) est incapable, même en présence de cellulose de faire fermenter des sucres

de constitution simple. C'est pour cette raison que nous avons entrepris les expériences qui vont suivre et qui ont pour but de rechercher les produits de dégradation résultant de l'action hydrolysante vis-à-vis de la cellulose et, en même temps, d'essayer de mettre en évidence une cellulase.

Recherche des produits de dégradation de la cellulose et essai de caractérisation d'une cellulase.

Quant à la recherche d'une cellulase nous nous sommes strictement adressé au procédé de Madame KHOUVINE-DELAUNAY (36) qui déclare s'être inspirée des travaux de PRINGSHEIM (59) d'après qui la cellulase microbienne est un endoferment. Nous avons pu vérifier ces résultats en ce qui concerne notre bactérie ; à cet effet nous avons effectué la préparation d'une culture sur 100 cc. de milieu renfermant 1 gramme de cellulose ; au moment où l'attaque de la cellulose était la plus active, nous avons saturé le substrat avec de la chloropicrine d'un côté, avec de l'iodoforme de l'autre afin d'arrêter toute fermentation. Nous avons employé la deuxième méthode en prenant comme antiseptique de l'iodoforme, premièrement pour suivre les indications de PRINGSHEIM (59), deuxièmement pour des raisons que nous exposerons plus loin. Après 3, 5 et 10 jours de repos à l'étuve, nous avons centrifugé 10 minutes en tubes stériles pour débarrasser la solution des fibrilles et des microbes ; après décantation du liquide qui surnage, nous avons lavé le résidu avec de l'eau physiologique et nous avons centrifugé de nouveau durant 10 minutes. Une fois l'eau physiologique décantée, nous avons un liquide dans lequel on pouvait rechercher une cellulase soluble et des débris de papier imprégnés de microbes à morphologie inchangée par la chloropicrine (dans le cas de l'iodoforme des cristaux de ce produit sont mêlés à ces débris) ; avec les liquides centrifugés et les résidus de fermentation nous avons fait les expériences suivantes :

1^o Nous avons plongé un fragment de papier stérile dans 5 cc. du liquide centrifugé et nous avons ajouté 1 cc. de toluène.

2^o Nous avons additionné à 5 cc. du milieu ordinaire, 5 cc. du liquide centrifugé et dans certaines tubes nous avons fait le vide, pour nous rapprocher des conditions habituelles de culture. Chaque tube contenait du toluène.

3^o Nous avons ajouté des résidus de fermentation au milieu de culture habituelle dans des conditions aérobies et anaérobies. Les tubes aérobies contenaient du toluène ; les tubes anaérobies nous servaient de témoins.

Nous avons, par ces expériences, vérifié les constatations faites par madame KHOUVINE (36) en ce sens que la chloropicrine a une action inhibitrice et mortelle sur notre bactérie seulement au bout de dix jours. Les prélèvements effectués au bout de trois et cinq jours nous ont montré qu'à ces périodes notre bactérie continuait à se développer et à attaquer la cellulose. Par contre l'iodoforme employé suivant la technique de PRINGSHEIM (59) tuait l'organisme très rapidement. Dans aucune des deux expériences nous n'avons pu observer une action diastasique du liquide centrifugé sur la cellulose. A ce point de vue notre bactérie répond aux mêmes propriétés que les organismes étudiés par PRINGSHEIM et madame KHOUVINE-DELAUNAY, c'est-à-dire : la cellulose sécrétée par notre bacille ne diffuse pas dans le liquide de culture : c'est un endoferment qui n'agit que lorsque le microbe vivant adhère intimement à la cellulose elle-même.

Mise en évidence des produits de dégradation :

Ayant constaté l'action lente et tardive de la chloropicrine employée par KHOUVINE pour arrêter la vie bactérienne, nous avons jugé utile d'abandonner ce produit et il nous semble que l'insuccès de Madame KHOUVINE en ce qui concerne la mise en évidence des produits de dégradation était dû à l'emploi de ce produit qui ne répond nullement aux conditions que PRINGSHEIM indique pour la mise en évidence des produits intermédiaires de la dégradation cellulosique.

PRINGSHEIM (59) pose comme conditions pour la mise en évidence de ces produits ce qu'il exprime dans les lignes suivantes : « Si l'on veut dans la fermentation de la cellulose par des bactéries, mettre en évidence uniquement l'action spécifique du ferment hydrolytique de la cellulose, il faut mettre en œuvre d'abord la fermentation à expérimenter, puis il faut attendre qu'elle soit à son maximum; puis arrêter brusquement la fermentation par l'addition d'un antiseptique approprié. L'arrêt subit et non progressif de la fermentation est la condition pour l'accumulation des produits de dégradation hydrolytique. Par un arrêt lent du processus fermentatif ou par une réapparition d'une fermentation même très faible, on ne peut mettre en évidence aucun produit intermédiaire, parce qu'ils échoient à l'action fermentative avant qu'ils soient remplacés par des nouveaux produits de dégradation de la cellulose et ils disparaissent ainsi du milieu nutritif des bactéries cellulophages ».

En tenant compte de ces conditions posées par PRINGSHEIM nous avons employé l'iodoforme dans les recherches qui suivent.

Cinq litres de milieu suivant ont été préparés :

Cellulose pure	10,0 gr
Chlorure de sodium	0,1 gr.
Phosphate dipotassique	0,5 gr.
Sulfate de magnésie	0,1 gr.
Nitrate d'ammoniaque	0,5 gr.
Carbonate de calcium	2,0 gr.
Eau	1000 cc.

A ce milieu nous avons ajouté une trace d'extrait de viande de Liebig; il a été ensemencé au moyen de fragments de cellulose attaqués par notre organisme, placé à l'étuve à $+ 40^{\circ}$ pendant dix jours; la fermentation était à cette période en pleine activité; nous avons alors préparé la solution d'iodoforme renfermant 0,5 gr. du produit pour 50 cc. d'acétone, dose qui correspond à 1 litre de milieu. Cette solution a été ajoutée au milieu en fermentation en agitant vigoureusement la culture afin d'obtenir une répartition parfaite de l'antiseptique. Le jour suivant nous avons filtré notre culture; le filtrat a été concentré par évaporation; l'extrait liquide a été précipité par l'alcool et le filtrat est évaporé à sec. Sur le résidu repris par l'eau nous avons effectué la réaction des osazones. Nous avons alors un mélange d'osazones, dont une partie est soluble dans l'eau, l'autre insoluble; nous avons ainsi pu séparer ces deux produits et par les mêmes recherches décrites antérieurement, pu mettre en évidence le cellobiose et le glucose.

Afin de démontrer aussi, biologiquement, la présence d'un disaccharide, résultant de la dégradation cellulosique et ayant des propriétés spécifiques, on a ensemencé encore 5 litres de notre milieu au moyen de la bactérie en étude, puis après avoir arrêté la fermentation, et effectué les différentes opérations nécessaires pour obtenir un résidu renfermant les sucres, on a introduit dans la solution aqueuse légèrement acidifiée, une culture de *Saccharomyces cerevisiae*, afin d'opérer la fermentation du glucose existant dans notre solution, à $+ 27^{\circ}$; huit jours plus tard nous avons filtré; on a chassé l'alcool formé par évaporation et dans le filtrat, effectué la recherche de la cellobiose qui s'est montrée encore positive.

De ces recherches on peut conclure que la bactérie mise en expérience attaque la cellulose par un endoferment non diffusible dans le milieu et dégrade le polysaccharide en passant par les stades cellobiose et glucose.

Caractérisation des produits ultimes de la dégradation cellulosique :

Nous avons effectué nos expériences sur des cultures de 30 à 50 jours pratiquées chaque fois sur 5 litres de milieu; le filtrat obtenu a été divisé en plusieurs portions.

Recherche du gaz carbonique :

A une partie de notre liquide nous ajoutons à froid un léger excès d'acide sulfurique étendu; nous distillons au réfrigérant ascendant en reliant l'extrémité de notre réfrigérant à un tube renfermant de l'eau de chaux; nous n'avons pas pu mettre en évidence de carbonate de chaux.

Acides volatils :

Nous avons distillé la plus grande partie; on a neutralisé à chaud par le carbonate de baryum; on a obtenu un précipité; nous avons filtré. Par addition d'une goutte de perchlorure de fer neutre étendu à une portion du liquide, il s'est produit à froid une coloration rouge foncée qui s'est transformée par chauffage en un précipité ocreux, lequel a disparu en continuant de chauffer. Une autre partie du liquide résultant de la filtration a été soumise à l'ébullition avec du nitrate d'argent; un précipité noir d'argent réduit s'est formé: donc présence d'acide formique. Une autre portion a été évaporée à sec dans une capsule et chauffée avec de l'acide sulfurique et de l'alcool; nous avons perçu une odeur très nette et caractéristique produite par le dégagement d'éther acétique.

Le résidu évaporé à sec et calciné en présence d'acide arsénieux nous a donné une odeur de cacodyle; donc présence d'acide acétique.

Acide butyrique :

D'autre part, nous avons agité le liquide de fermentation avec de l'éther saturé d'eau, laissé reposer, décanté l'éther, évaporé ce liquide. Une partie du résidu a été dissoute dans une petite quantité d'eau, on a neutralisé le liquide obtenu, ajouté une petite quantité de solution diluée neutre de perchlorure de fer; à froid nous obtenons une coloration rouge sang et en chauffant un précipité rouge brun formé d'acétate ferrique (nouvelle caractérisation de l'acide acétique).

Une autre portion du résidu est dissoute dans quelques gouttes d'eau et nous avons ajouté un cristal de chlorure de calcium; à la surface du liquide on a constaté l'apparition de gouttelettes oléagineuses à réaction acide; cette réaction est caractéristique de l'acide butyrique.

Une autre portion du résidu est chauffée avec un mélange à parties égales d'alcool et d'acide sulfurique; on obtient une odeur d'ananas caractérisant le butyrate d'éthyle.

Acide lactique :

Après avoir débarrassé le liquide de fermentation des acides volatils, on le concentre et on filtre pour obtenir une solution limpide et incolore. A un volume de ce liquide on ajoute 2 volumes du réactif d'UFFELMANN préparé de la façon suivante. Mélanger :

1 goutte de solution de perchlorure de fer
6 gouttes d'acide phénique crist.
30 cc. d'eau.

Ce réactif présente une coloration bleue violette. Après mélange avec le liquide de fermentation nous obtenons une coloration rouge violette, passant immédiatement au jaune vert; d'autre part nous avons, afin d'éviter toute erreur, employé une autre portion du liquide de fermentation débarrassé des acides volatils que nous avons traité avec de l'éther saturé d'eau et ceci à plusieurs reprises; après repos, l'éther est décanté chaque fois et les différentes portions sont réunies; on évapore l'éther; une partie du résidu est repris par la vapeur d'eau et on y ajoute du carbonate de zinc; on chauffe, on filtre et on fait évaporer au bain-marie. Nous obtenons des cristaux en prismes quadrangulaires qui sont examinés microscopiquement; ils se réunissent en étoiles et présentent l'aspect caractéristique du lactate de zinc.

D'autre part, une autre partie de la solution éthérée a été mise au contact d'acide sulfurique et une solution alcoolique de codéine à 5%; on obtient une coloration brune caractérisant la présence d'acide lactique.

Nous avons donc, par ces réactions d'identité, pu caractériser dans les produits de la dégradation cellulosique les acides suivants :

Acide formique, dont la présence nous prouve que le méthane est un des produits de la dégradation.

Acide acétique.

Acide butyrique.

Acide lactique.

Nous tenons à faire remarquer ici que l'assimilation de la cellulose par notre bactérie passe par les mêmes stades cellobiose et glucose comme pour certains des champignons inférieurs que nous avons étudié précédemment; mais toutefois les produits ultimes de cette dégradation sont déviés dans le cas du bacille : chez le champignon il y a production d'alcool et de CO^2 tandis que pour la bactérie il y a élaboration des produits que nous venons de citer.

Cette bactérie se distingue nettement des espèces cellulophages décrites jusqu'à présent par son pouvoir anaérobie facultatif, son action cellulolytique exclusivement produite par ses formes sporulées et par la formation d'endospores, nous proposons de lui donner le nom de *Bacillus cellulosaе cerambycidus* n. sp.

CHAPITRE VI

Les microorganismes isolés de la lumière de l'intestin chez les insectes étudiés existent-ils dans les essences de bois où vivent ces insectes?

CHAPITRE VI

Les microorganismes isolés de la lumière de l'intestin chez les insectes étudiés existent-ils dans les essences de bois où vivent ces insectes ?

Sur les conseils de monsieur le professeur MOLLIARD, notre président de thèse, nous avons entrepris des expériences ayant pour but de rechercher si les microorganismes isolés de la lumière du tube digestif des insectes étudiés ne préexistaient pas dans le milieu où vivaient ces individus.

D'après les travaux de SCHNEIDER-ORELLIS (100, première partie), certains insectes xylophages tels que *Xyleborus dispar* vivent dans le bois où ils creusent des galeries qu'ils débarrassent après leur travail de la sciure de bois ; les parois de ces galeries se couvrent de champignons inférieurs dont on peut retrouver les spores dans l'intestin des insectes. De même pour l'*Hylecætus dermestoides* ; les *Siricidiens* vivent dans des galeries où poussent des *Basidiomycètes*. Dans tous ces cas les champignons sont spécifiques et il semble, dit l'auteur, qu'ils soient nécessaires pour fournir aux insectes xylophages une enzyme susceptible de leur rendre la cellulose assimilable.

Dans les recherches que nous avons entreprises, nous avons pensé qu'il était utile de considérer trois cas suivant que nous pratiquions nos expériences sur du bois sain, sur du bois attaqué par les insectes, provenant de parois des galeries et enfin sur des débris de sciure et des déchets ligneux accumulés par l'insecte.

Dans chacun de ces trois cas, nous avons considéré les bois spécifiques pour chacun de nos insectes :

Le saule pour le *Cossus cossus*, LINNÉ.

Le peuplier pour le *Sciapteron tabaniformis*, ROTT.

Le chêne pour le *Cerambyx scopolii*, FÜSSL.

Mode opératoire :

Bois sain : En ce qui concerne les échantillons de bois sain, nous avons opéré de la façon suivante : le bois a été prélevé par

découpages en tronçons au moyen d'instruments stériles; il a été enveloppé dans du papier Joseph stérile. Au Laboratoire on a exécuté plusieurs lavages des tronçons : un premier dans de l'eau oxygénée, un second dans une solution faible de lysoforme et enfin un troisième dans de l'eau distillée stérilisée. Les tronçons ont alors été introduits dans notre chambre à dissection stérile après tamponnage au papier-filtre stérilisé. Dans la boîte on réduit le bois en petits fragments fins au moyen d'une lime à bois (râpe), puis on les ensemece sur nos divers milieux en boîte de PETRI.

Bois provenant des parois de galeries :

Sur place nous avons exécuté avec précaution des prélèvements de tronçons infestés par les insectes envisagés; ces morceaux de bois ont été transportés en récipients stériles au Laboratoire où nous avons obturé à la cire les orifices des galeries, puis ces divers tronçons ont subi les trois lavages dont nous avons parlé à propos du bois sain; ils ont été ensuite introduits dans la chambre à dissection où a eu lieu le découpage de ces fragments de façon à ouvrir longitudinalement les galeries. On a effectué les prélèvements destinés à l'ensemencement, par raclage à la lime à bois des parois des galeries.

Bois provenant des déchets résultant du travail des insectes :

On a prélevé la poussière ligneuse accumulée en certains points des galeries et elle a servi à l'ensemencement d'un troisième lot de boîtes de PETRI (pour chaque insecte envisagé).

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Bois sain : Pour chacun des insectes envisagés, les ensemencements ne nous ont pas permis de retrouver dans le bois sain aucun des organismes isolés de la lumière du tube digestif.

Bois provenant des parois de galeries :

En ce qui concerne le *Cossus cossus* LINNÉ, les ensemencements de particules de bois provenant du raclage des parois des galeries creusées par l'insecte, nous ont amené à constater la croissance d'un *Fusarium* que nous avons identifié après isolement et étude morphologique et biologique avec le *Fusarium rubiginosum* APPEL et WOLLENWEBER, isolé de la lumière du tube digestif du *Cossus cossus*, LINNÉ.

Le bois des parois de galeries percées par le *Sciapteron tabaniformis* nous a donné par ensemencements sur les milieux végétaux et séparation des germes un *Fusarium* présentant les caractères morphologiques et biologiques de *Fusarium metachroum* APPEL et WOLLENWEBER.

Ajoutons ici que des fragments de bois des galeries abandonnés pendant quelques mois dans les cages nous ont montré la croissance de filaments mycéliens. Par ensemencements de ces microorganismes sur divers milieux, nous avons pu voir qu'il s'agissait en l'espèce de *Fusarium rubiginosum* APPEL et WOLLENWEBER pour le bois provenant des cages de *Cossus cossus* LINNÉ et de *Fusarium metachroum* APPEL et WOLLENWEBER en ce qui concerne le *Sciapteron tabaniformis* ROTT.

Quant au *Cerambyx scopolii* FÜSSL, en aucun cas il ne nous a été possible de vérifier la présence dans le bois de la levure et de la bactérie trouvées dans l'intestin.

Déchets de bois résultant du travail des insectes :

Les ensemencements pratiqués au moyen de déchets de bois accumulés çà et là en certains points des galeries nous ont donné une croissance luxuriante de *Mucor spinosus* VAN TIEGHEM en ce qui concerne le *Cossus cossus*, le *Mucor piriformis* RABENHORST et le *Mucor alternans* VAN TIEGHEM pour le *Sciapteron tabaniformis*.

CHAPITRE VII

Considérations générales sur la transformation
de la cellulose chez certains insectes xylophages

CHAPITRE VII

Considérations générales sur la transformation de la cellulose chez certains insectes xylophages

Jusqu'ici, d'après les diverses recherches de VAN ITERSON (34), WINOGRADSKY (77), OMELIANSKY (54) et PRINGSHEIM (59), en ce qui concerne la dégradation de la cellulose par les microorganismes, nous avons à envisager les catégories suivantes :

1^o Anaérobie : en l'absence de nitrate de potassium, par des bactéries de la fermentation, aboutissant au méthane et à l'hydrogène.

2^o Anaérobie : en présence du nitrate de potassium, par des bactéries dénitrifiantes.

3^o Aérobie : en solution faiblement alcaline par des bactéries.

4^o Aérobie : en solution faiblement acide par des champignons.

Nos recherches nous conduisent à créer une cinquième catégorie constituée par :

5^o Anaérobie : en solution faiblement acide par des champignons.

Bactéries

Pour ce qui est des bactéries dont, pour ainsi dire, l'action sur la cellulose est la seule bien étudiée jusqu'à présent, les produits définitifs de dégradation résultant de la fermentation cellulosique peuvent être classés en 4 groupes :

1^o Fermentation méthanique de la cellulose : Méthane, anhydride carbonique, acides gras inférieurs jusqu'à l'acide butyrique.

2^o Fermentation hydrogénée : Hydrogène, anhydride carbonique, acides gras inférieurs jusqu'à l'acide butyrique.

3^o Fermentation thermophile : Méthane, hydrogène, anhydride carbonique, acide formique et acide acétique.

4^o Fermentation dénitrifiante : Azote et carbone.

De cette énumération il résulte que l'on n'a pu mettre en évidence aucun produit de dégradation purement hydrolytique des polysaccharides, dans la fermentation ordinaire de la cellulose.

Dans la fermentation ininterrompue ou même dans un processus de fermentation partielle et lente, on ne peut trouver des produits intermédiaires dans la décomposition de la molécule cellulosique, parce que ceux-ci sont immédiatement et avant que de nouveaux produits dégradés de la cellulose aient eu le temps de se former, attaqués par l'enzyme de la fermentation et ainsi disparaissent complètement du milieu habité par les bactéries cellulophages.

C'est donc ici que réside la difficulté du problème, en ce qui concerne la démonstration et l'identification des produits intermédiaires de la dégradation progressive de la cellulose par les bactéries.

A ce point de vue nous savons depuis les travaux de VAN ITERSON (34) que, en présence de produits antiseptiques modérés comme le xylol, le chloroforme, l'iodoforme, les réactions de pure fermentation sont immédiatement inhibées, tandis que par contre, tous les ferments hydrolytiques poursuivent leur action, même en présence de corps antiseptiques (ABDERHALDEN, PRINGSHEIM) (1,59)). En appliquant ces deux faits, nous avons la possibilité de séparer les produits nés de la dégradation hydrolytique de ceux de la fermentation pure, par conséquent de fractionner l'ensemble des ferments produits par un organisme déterminé. Dans ce cas l'action hydrolytique se poursuit et l'action fermentative pure est arrêtée.

Partant de ce raisonnement, on a essayé de séparer la dégradation hydrolytique de la cellulose de l'action fermentative des bactéries. Par conséquent, nous avons mis en train la fermentation et attendu le maximum de son action,; aussitôt cet état atteint, que l'on peut facilement contrôler par la quantité des gaz dégagés, nous avons, en ajoutant un antiseptique approprié, arrêté brusquement cette action. Cet arrêt brusque et définitif de la fermentation est la condition « sine qua non » pour recueillir les produits de la dégradation hydrolytique qui sont constitués par des sucres. La formation de ces produits de la dégradation hydrolytique se reconnaît par une faible réduction de la solution de fermentation par la liqueur de Fehling ; cette réaction devient très nette après un intervalle de quelques jours et surtout lorsque l'on travaille avec une grande quantité de milieu que l'on concentre après, par évaporation dans le vide, à la même température. La dégradation hydrolytique de la cellulose conduit, comme nous l'avons vu, directement au cellobiose, de la même façon que l'amidon donne par fermentation hydrolytique, comme premier produit stable, le disaccharide : le maltose. Dans des conditions normales de température, la décomposition hydrolytique dépasse alors la formation de disaccharide pour former le monosaccharide : le glucose ; ce fait est dû très probablement à la

présence simultanée de la cellobiase chez les agents de la fermentation cellulosique ; ce ferment a été trouvé par G. BERTRAND et HOLDERER (9) dans l'émulsine et chez quelques espèces de champignons appartenant aux moisissures.

Nous voyons par conséquent que l'action fermentative et la vie des bactéries cellulophages sont séparées complètement au point de vue action : la fermentation pure est réalisée seulement dans les limites des fonctions vitales ; elle est en opposition très marquée avec l'hydrolyse de la cellulose. Le fractionnement des différents ferments par des agents externes, soit par des antiseptiques chimiques, soit par des agents physiques comme les variations de température, est facilement réalisable.

Se basant sur ces faits, PRINGSHEIM est arrivé, en employant comme antiseptique une solution au 1/50 d'iodoforme dans l'acétone, à éliminer le pouvoir fermentatif pur ; en même temps il a supprimé, par chauffage à $+67^{\circ}$, température limite pour la cellulase, l'action de la cellobiase ; il reste alors comme produit unique de la décomposition cellulosique, le cellobiose, produit hydrolytique qui est formé par action de la cellulase sur la cellulose. PRINGSHEIM a démontré que cette cellulase est une endoenzyme qui est sécrétée seulement sous l'influence de l'irritation qu'exerce la cellulose sur la cellule bactérienne. Dans tous les cas, il est prouvé que la décomposition fermentative de la cellulose est précédée par une hydrolyse aboutissant au cellobiose et au glucose, mais toujours, cette décomposition de la cellulose par des bactéries arrive finalement aux produits ultimes du métabolisme cellulosique : Méthane, hydrogène, anhydride carbonique et azote d'un côté et, de l'autre, des acides gras inférieurs comme l'acide butyrique, l'acide formique, l'acide valérianique et l'acide acétique.

En dirigeant nos recherches dans une autre direction, nous avons été amené à étudier les produits de la dégradation de la cellulose et de l'assimilation cellulosique par des champignons inférieurs agissant en aérobie et en anaérobie. Nos expériences ont été effectuées avec les mêmes méthodes mentionnées à propos de la technique bactérienne et dans les mêmes conditions. Au cours de celles-ci, la première différence constatable dans cette dégradation est l'absence totale de la production de gaz, fait toujours très manifeste dans la fermentation de la cellulose par les bactéries ; malgré cela, les champignons ont une action énergique et quantitativement forte sur la cellulose mise à leur disposition. L'assimilation cellulosique passe, dans ce cas aussi, par les stades di- et monosaccharides qui sont identifiables comme des hydrates de carbone réduisant spontanément ou après interversion la liqueur de FEHLING. Ces hydrates de carbone sont toujours très intimement liés aux cellules des cham-

pignons et peuvent être mis en évidence d'un côté par voie microchimique (réactions), d'un autre côté par plasmolyse préalable des cellules mycéliennes. Ces réactions ont été effectuées avec la liqueur de FEHLING, le réactif de MOLISCH, ceux de BIAL et de SÉLIVANOFF.

En outre nous avons effectué la recherche de l'acide glycuronique de la manière suivante : notre solution acide résultant de l'action de l'acide sulfurique à 1,25 % sur la cellulose a été filtrée ; on y a ajouté une solution de naphto-résorcine et une petite quantité d'acide chlorhydrique ; après contact de quelques minutes on agite le tout avec de l'éther ; la solution éthérée prend une coloration rouge violette avec l'acide glycuronique.

La dégradation fermentative ultérieure traverse des stades tout à fait différents et nous n'avons jamais, dans chaque cas qui s'est présenté à nous, pu mettre en évidence comme produits ultimes du métabolisme cellulosique cryptogamique, ni des acides gras volatils, ni méthane ou hydrogène ; par contre nous avons toujours identifié avec les réactifs de GÜMMING, LEGAL, LIEBEN des substances formant de l'iodoforme, donc des produits alcooliques ou acétoniques. En outre, nous avons trouvé dans quelques cas une réaction positive avec le réactif de UFFELMANN de l'acide lactique. Ces faits ont été aussi vérifiés expérimentalement au moyen d'essais biologiques. Les *Oomycètes* isolés par nous ont été cultivés à cet effet sur des milieux qui renfermaient comme source de carbone, de la cellulose pure et de l'alcool ; nous avons pu constater que ces champignons se développaient, quelques-uns dans des concentrations alcooliques allant jusqu'à 5/100, mais dans ces recherches la cellulose a toujours été très peu attaquée. Il paraît donc que ces organismes tirent le carbone qui leur est nécessaire de l'alcool ; nous avons profité de cette constatation pour isoler par passages successifs en milieux alcooliques dans des milieux impurs, des champignons de bactéries, en tuant ces dernières. Ici se pose la question suivante : A quelle catégorie appartiennent les ferments qui entrent en jeu ? Nous pourrions avoir affaire à un ferment soluble dans l'eau qui passe ainsi dans le milieu extérieur et pourrait agir à distance ou à un ferment qui est produit par les agents assimilateurs de la cellulose seulement, par une irritation du polysaccharide sur la cellule fungique. Cette question a été relativement très facile à résoudre chez la bactérie cellulophage, car le fait que ces organismes poussent uniquement en contact intime avec la cellulose élimine toute action à distance de l'agent dégradateur. Il ne peut donc, dans ce cas, pas être question d'exodiasèses ; pour ce qui est des champignons il en est tout autrement, car ils se développent en général aussi sur les milieux sucrés usuels ou sur d'autres substrats hydrocarbonés. Ces organismes ne sont donc pas réduits à puiser leur carbone dans une source élective

et on pourrait supposer une action sur la cellulose de ces micro-organismes sans contact direct, donc par des exodiasases solubles.

Deux séries d'expériences nous ont donné les renseignements nécessaires. Nous avons tout d'abord préparé des milieux non spécifiques; après trois semaines de croissance ces cultures ont été filtrées aseptiquement à travers une bougie Chamberland et nous avons ainsi séparé les spores, le mycélium et les hyphes du suc pouvant renfermer les ferments solubles. Ce liquide a été examiné au point de vue de sa stérilité, par ensemencement sur divers milieux et nous a donné la preuve qu'aucun germe ne pouvait entrer en question. Le suc stérile a été d'autre part réparti dans trois flacons et on a ajouté des bandes de cellulose rectangulaires de poids connu; après trois semaines aucune attaque de la cellulose n'a pu être mise en évidence. Nous avons ensuite réensemencé des cultures sur milieu ne renfermant que des substances simples et en plus de la cellulose, matière spécifique. Après trois semaines de contact nous avons pu constater sous une couche homogène formée par le mycélium, une masse pâteuse et fibreuse qui représentait les vestiges de la cellulose décomposée. Le mycélium et les restes des fibres cellulosiques ont été de nouveau séparés du suc renfermant les enzymes, par filtration à travers la bougie Chamberland. Le liquide diastasique a été stérilement réparti en trois flacons auxquels on ajoutait des bandes de cellulose pure stérilisée, de poids connu. Après trois semaines de contact, nous avons pu constater une légère attaque de la cellulose, qui toutefois n'était aucunement en proportion avec la décomposition de la cellulose par le champignon vivant. Nous avons alors eu recours aux méthodes expérimentales de OPPENHEIMER (55) et de HOLDERER (9) qui ont constaté que presque toutes les diastases ne passent pas sans modification à travers la bougie Chamberland. Nous avons, pour ces raisons, employé la méthode indiquée par HOLDERER. Celle-ci a l'avantage de filtrer les liquides diastasifères au même pH et de ramener les diastases en expérimentation après la filtration à un pH identique pour chaque souche envisagée, de sorte que la concentration en ions H des liquides diastasiques reste constante. C'est BOURQUELOT (13) qui, le premier, observa l'importance primordiale de la réaction du milieu pour la diffusion des diastases et les travaux de HOLDERER et de COLIN nous ont déterminé à modifier notre premier procédé pour la caractérisation des diastases, car la différence de l'attaque de la cellulose existant entre la culture proprement dite des champignons cellulophages et le liquide diastasifère de la filtration nous a donné l'idée d'avoir aussi, dans ce cas, affaire à une endodiasase, c'est-à-dire à un ferment qui passe seulement sous les conditions spéciales à travers la membrane cellulaire et dont l'extraction nécessite des artifices. La méthode de

HOLDERER devait donc nous donner satisfaction. Le mycélium des cultures avec les parties cellulosesiques est aseptiquement lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée stérilisée ; puis il est mis en macération pendant douze heures à une température de $+37^{\circ}$ dans 140 centimètres cubes d'eau distillée stérilisée + 10 centimètres cubes de solution de phosphate trisodique à 10/100. Les récipients sont agités à diverses reprises ; ensuite le mélange est neutralisé avec une solution N/10 d'acide chlorhydrique ; on laisse en contact pendant 2 heures et on filtre à travers une bougie Chamberland. En alcalinisant l'eau de macération, nous obtenons une solution diastasique aseptique préparée par plasmolyse de mycelium frais. Cette solution stérile est introduite dans trois flacons avec des bandes de cellulose de poids connu (stérilisées). Les flacons sont placés à $+37^{\circ}$; après 15 jours de contact nous avons une dilacération de la cellulose ; 8 jours plus tard la cellulose était à ce point décomposée qu'en agitant on obtenait une masse pâteuse ; la croissance de germes cryptogamiques ou bactériens n'a jamais été observée dans les récipients. Par conséquent, nous ne pouvons qu'avoir affaire à un ferment décomposant la cellulose, ferment qui est endocellulaire et n'agit que par contact direct avec la cellulose ; donc les champignons, eux aussi, ne forment des diastases cellulosesiques que par une sorte d'irritation cellulaire.

La dégradation de la cellulose est par conséquent purement fermentative et les premiers stades nets de la décomposition sont le cellobiose et le glucose. En ajoutant au milieu des antiseptiques comme le xyloë ou l'iodoforme, l'action du suc diastasifère filtré ne diminue en aucune façon la dégradation de la cellulose ; nous avons donc affaire à une fermentation hydrolytique ; celle-ci se continue cependant dans un tout autre sens que la fermentation bactérienne et les produits simples résultant de ce processus sont, comme nous l'avons déjà indiqué, très différents de ceux de la fermentation bactérienne. Si nous ajoutons notre liquide diastasifère, obtenu par un simple jeu de forces osmotiques, dans une solution de glucose, nous constatons bientôt une fermentation alcoolique. Il s'agit donc dans ce cas d'un ferment analogue à la zymase. L'acide lactique constaté quelquefois dans nos milieux nutritifs mis en expérience vient encore renforcer cette conclusion et le processus entier de la dégradation de la cellulose par nos champignons rappelle fortement la théorie émise, d'une part par BUCHNER et MEISENHEIMER (14), d'autre part celle de WOHL, BUCHNER et FEHRENBACH. Cette dernière théorie s'appuie sur la présence d'acide lactique et de produits formant de l'iodoforme avec la solution iodo-iodurée et de la potasse (réaction de LIEBEN). Tous ces produits ont été mis en évidence dans nos recherches et leur présence vient renforcer la théorie pré-

cédente émise dans le but d'expliquer la fermentation des solutions sucrées par les levures. La formation de ces produits dégradés et la marche de ces réactions sont d'autant plus facilement explicables que nous avons affaire à des champignons qui peuvent respirer en aérobie et en anaérobie et même chez quelques espèces nous avons pu prouver que l'intensité de la dégradation cellulosique, par conséquent de la formation de diastases, était beaucoup plus rapide et plus prononcée en anaérobiose.

Après avoir constaté la différence de cette assimilation cellulosique entre la fermentation bactérienne et la fermentation par des champignons, il nous a semblé intéressant d'examiner l'action simultanée exercée sur la cellulose par la bactérie et le champignon trouvés en même temps dans le tube digestif d'insectes expérimentés (*Cerambyx*). Nous rendant compte d'un autre côté de l'action des antiseptiques inhibiteurs sur la fermentation pure proprement dite et cumulatrice en ce qui concerne l'élaboration des produits de la fermentation hydrolytique, nous avons été amenés à procéder de la façon suivante :

On a ensemencé sur un milieu cellulosique la bactérie cellulophage et mis en train une fermentation caractérisable par un dégagement gazeux ; à ce moment nous avons réensemencé ce milieu au moyen de la levure provenant du même insecte ; quelques heures plus tard, nous avons pu constater que le développement gazeux cessait ; la fermentation proprement dite était arrêtée ; nous voyons donc déjà dans ce fait que la présence du champignon agit sur la fermentation bactérienne de la même façon que ferait un antiseptique. Par analyse quantitative effectuée après quelques jours, en comparaison avec le témoin, nous avons pu démontrer une action cumulatrice pour les produits de dégradation du premier stade (cellobiose et glucose). C'est sans doute de ce stade que l'insecte profite le plus pour assimiler sa nourriture qui lui est ainsi offerte par les hôtes de son tube digestif (bactéries et champignons). Le profit que tirent de la cellulose les insectes xylophages, comme les autres animaux capables d'assimiler la cellulose qui était si difficile à mettre en évidence, semble être démontré d'une façon simple par la caractérisation et l'identification des hydrates de carbone solubles, produits intermédiaires dans la dégradation progressive de la fermentation cellulosique. Les ferments hydrolytiques des microorganismes habitant le tube digestif des animaux xylophages mettent à la disposition de l'organisme du cellobiose et du glucose. Ces sucres sont pour la plus grande partie assimilés parce que le champignon inférieur présent empêche les ferments purs de la bactérie de poursuivre la fermentation jusqu'aux produits simples et ultimes. Ces bactéries semblent très utiles pour amorcer la fermentation cellu-

losique afin de créer tout d'abord les conditions indispensables pour la végétation et l'assimilation du champignon (production d'acides gras inférieurs diminuant la valeur du pH du tube digestif).

Toutefois dans nos recherches effectuées sur les larves de *Cossus cossus* et de *Sciapteron tabaniformis*, nous avons pu voir que l'assimilation de la cellulose peut être réalisée en l'absence complète de germes bactériens et que l'action simultanée de champignons du groupe des *Oomycètes* et des *Fusarium* semble être d'une grande utilité pour la larve.

Dans le cas du *Cossus cossus* par exemple, nous avons pu mettre en évidence la présence simultanée de *Mucor spinosus* et de *Fusarium rubiginosum*.

Dans le cas du *Sciapteron tabaniformis* nous avons isolé à la fois deux phycomycètes : *Mucor alternans* et *Mucor piriformis* et un *Fusarium* : *Fusarium metachroum*.

Parmi ces organismes nous avons vu que les *Oomycètes* assimilent la cellulose électivement en milieu spécifique, c'est-à-dire en l'absence de tout autre hydrate de carbone ; en outre ces champignons se résolvent à produire une enzyme protéolytique uniquement sur les milieux très pauvres en matières quaternaires ; le maximum de dégradation est produit dans les milieux renfermant de l'azote sous forme de base ; de plus l'action cellulolytique augmente par la vie en anaérobiose.

Si nous comparons ces faits avec ceux constatés par nous à propos des *Fusarium*, nous voyons que ces derniers assimilent la cellulose même en présence d'hydrates de carbone simples ; seule une forte proportion de mono- ou de disaccharides vient inhiber l'action cellulolytique. La meilleure assimilation se fait dans les milieux renfermant des matières quaternaires de molécule relativement élevée (peptones) ou des nitrates en présence de petites quantités d'extrait de matières fécales. L'aérobiose favorise nettement le phénomène.

Nous avons donc une sorte d'association entre deux organismes ou deux groupements doués de propriétés toutes différentes vis-à-vis de l'assimilation cellulosique. Il nous semble que chez les larves xylophages que nous avons examinées la dégradation cellulosique amorcée par les *Fusarium* qui agissent au commencement du tube digestif mettent à la disposition de la larve les matières azotées renfermées dans le bois sous forme de nitrates transformés en corps azotés organiques seuls utiles à l'insecte et forment d'autre part des produits hydrocarbonés. Cette fermentation qui, même in vitro, est très active et rapide, semble être orientée et régularisée par l'intervention des *Oomycètes* qui agissent surtout en anaérobiose et en l'absence de matières quaternaires.

Ces hypothèses trouvent un appui dans les recherches histologiques qui nous ont prouvé que les *Fusarium* sont rencontrés toujours dans la partie moyenne du tube digestif tandis que les *Oomycètes* habitent les parties postérieures.

D'autre part, sachant que les plantes supérieures servent d'habitat et de nourriture à nos insectes, les produits azotés se trouvent à l'état de nitrates et de nitrites, il est tout naturel qu'il faut le travail préalable des *Fusarium* assimilant la cellulose électivement en présence de ces sels pour préparer ainsi le terrain aux *Mucorinées* qui eux reprennent le travail et semblent être les principaux agents de l'assimilation cellulosique mettant à la disposition des insectes les matières nutritives hydrocarbonées directement assimilables.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1^o Nous avons pu démontrer que certains organismes isolés de la lumière du tube digestif de certaines larves xylophages étaient capables de dégrader la molécule cellulosique par l'action d'un endo-ferment sécrété par eux uniquement en présence de cellulose. Il s'agit là d'une excitation spécifique résultant du contact intime de la cellule bactérienne ou fungique avec la matière cellulosique. Ces microorganismes semblent contribuer pour une large part à la digestion de la cellulose et à son assimilation par l'insecte.

II. Les produits intermédiaires résultant de cette dégradation, utiles pour l'hôte sont : le cellobiose, le glucose et l'acide glycuronique. La décomposition plus avancée est dirigée suivant deux directions :

a) *fermentation bactérienne* aboutissant aux produits suivants : Hydrogène, méthane, azote, acides gras volatils, acides butyrique et lactique.

b) *fermentation fungique* donnant naissance à de l'alcool, de l'anhydride carbonique, de l'acétone, de l'acide lactique.

Les produits intermédiaires ont tout d'abord pu être mis en évidence par l'addition d'un antiseptique très actif agissant suivant les principes donnés par VAN ITERSON (34) et PRINGSHEIM (59); d'autre part, nous avons pu démontrer que l'infection d'une culture de bactérie cellulophage par une levure et la présence simultanée de deux champignons produisant des enzymes différentes sous l'action des mêmes produits nutritifs, amène au même but que celui qui était atteint par suite de l'addition de l'antiseptique précédent, c'est-à-dire : accumulation des produits intermédiaires issus d'une action hydrolysante et inhibition nette de l'action fermentative due aux phénomènes vitaux.

3^o Nous avons pu démontrer qu'il existe en dehors des bactéries cellulophages agissant uniquement en anaérobie, des organismes inférieurs appartenant à l'embranchement des *Thallophytes* qui, les uns augmentent leur pouvoir cellulolytique en présence de matières quaternaires complexes et ceci en raison directe de la vie aérobie et du degré de température (jusqu'à la limite de l'optimum vital),

les autres ayant une action cellulolytique élective et optima sur milieux spécifiques et très pauvres en matières nutritives et dont les enzymes cellulolytiques augmentent en anaérobiose. L'influence modificatrice des milieux et des conditions de culture est donc très importante pour les recherches in vitro de l'action cellulolytique des différents organismes venant en question dans le problème de l'assimilation de la cellulose.

4^o Nous voyons que la propriété de dégrader la cellulose n'est pas limitée à un groupe de bactéries définies, mais qu'un grand nombre de microorganismes est capable, dans des conditions appropriées, de détruire la molécule cellulosique complexe; tandis que l'isolement et la culture des bactéries cellulophages offrent de grandes difficultés, la culture et l'isolement des champignons cellulophages sont relativement faciles à réaliser, car ils possèdent la faculté d'assimiler les hydrates de carbone simples.

5^o Nous avons, par des travaux d'ordre morphologique et biologique, pu isoler des organismes en culture pure ayant une action spécifique vis-à-vis de la cellulose et dans le rôle de l'assimilation de ce polysaccharide chez les insectes xylophages et nous avons réussi, par ces travaux, à caractériser chez la larve de *Cossus cossus* LINNÉ deux microorganismes utiles au métabolisme nutritif: *Mucor spinosus*, VAN TIEGHEM, *Fusarium rubiginosum*, APPEL et WOLLENWEBER.

Chez la larve de *Sciapteron tabaniformis*, ROTTE, nous avons pu déceler la présence de *Mucor alternans*, VAN TIEGHEM, *Mucor piriformis*, RABENHORST, *Fusarium metachroum*, APPEL et WOLLENWEBER.

Chez le *Cerambix scopolii*, FÜSSL, une levure du genre *Willia* et pour laquelle nous avons proposé le nom de *Willia saturnus*, KLÖCKER, var. *cerambycida* et une bactérie facultativement aérobie, mais agissant spécifiquement sur la cellulose en anaérobiose stricte, qui est une espèce nouvelle se caractérisant par la formation d'endospores et la présence de cils polaires, ses propriétés biologiques, son aptitude aux diverses colorations. Nous avons proposé pour elle le nom de *Bacillus cellulosae cerambycidus* n. sp.

4^o Les recherches entreprises au sujet du bois des arbres dans lesquels vivent les insectes étudiés nous ont donné les résultats suivants: a) En ce qui concerne le bois sain nous n'avons jamais retrouvé les germes isolés de l'intestin.

b) Nous avons pu, par contre, obtenir des cultures à partir du bois provenant des raclages des galeries, des deux *Fusarium* isolés du tube digestif de *Cossus cossus* et de *Sciapteron tabaniformis* et, par ensemencements de déchets de bois accumulés en certains points des galeries, retrouver le *Mucor spinosus*, le *Mucor alternans* et le *Mucor piriformis*.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

1re Partie

- 1° ALEKAN : Voir : Grandeau (37).
- 2° ANKERSCHMITT : Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. *Centr. f. Bakt.*, Abt. I, 1905, 39, p. 359, 576, 687 ; 1906, 40, p. 100.
- 3° APPEL (Otto) : Beiträge zur Kenntnis der Fusarium und der von ihnen hervorgerufenen Pflanzenkrankheiten. Arbeiten aus der *Biologischen Abteilung für Land- und Forstwirtschaft*, Bd. 5, Heft 4, Berlin, 1906, p. 155.
- 4° APPEL et WOLLENWEBER : Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium. Arbeiten aus der *Biologischen Abteilung für Land- und Forstwirtschaft*, Bd. , H., , Berlin, 1910, p. .
- 5° ARONSTEIN : Voir : Kuhn (63).
- 6° BARANY (R.) Ueber ein neues zellulosereiches Brot und seine Verwendung bei Darmträgheit, Fettleibigkeit und Diabetes. *Wiener Med. Woche*, 1902, n° 9, p. 411.
- 7° BARY (de) : Bot. Zeit., 1886, B. 44, p. 377.
- 8° BEHRENS (J.) : Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis. Landwirt. Bot. Versuchsanst. Karlsruhe, *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, Bd. 4, 1897, p. 514.
- 9° BEIJERINCK : L'influence des microbes sur la fertilité du sol. *Arch. néerl. des sciences*, 1904, 2^e série, 9, p. 8.
- 10° BEIJERINCK et MINKMANN : *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1910, Bd. 25, p. 30.
- 11° BERGMAN (P.) : Studien über die Digestion der Pflanzenfresser. *Skand. Arch. Physiol.*, 1906, 18, p. 119.
- 12° BERTHELOT (M.) : Remarques sur la fermentation forménique. *C. R. Ac. Sc.*, 1889, 109, p. 841. *Bull. Soc. Chim.*, 1890, 3, p. 331.
- 13° BEVAN : Voir : Gross (21).
- 14° BIEDERMANN et MORITZ : Ueber ein zelluloselösendes Enzym im Lebersekret der Schnecke (*Helix pomatia*). *Arch. ges. Physiol.*, 1898, 73, p. 219.

- 15° BLAXALL : Voir : Mac Fayen (69).
- 16° BROWN (H. T.) : On the search for a cellulose dissolving (cyto-hydrolytic). Enzyme in the digestive tract of certain grain-feeding animals. *J. Chem. Soc.*, 1892, I, 61, p. 352.
- 17° BURILL : Voir : Merker : *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 31, 1910, p. 580.
- 18° CARBONE et MARINCOLA-CATTANEO : *Archivio di Farmacol. Speriment.* Vol. III, 1908, p. 39. Ref. *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.* II, 1909, Bd. 23, p. 239.
- 19° CARBONE : Sulla decomposizione aerobica della cellulosa. *Bull. Soc. Méd. Chim.*, 1911.
- 20° CHOUKEVITCH (J.) : Flores bactériennes du gros intestin du cheval. *Ann. Inst. Pasteur*, 1911, 25, p. 247, 345.
- 21° CROSS et BEVAN : Cellulose : an outline of the chemistry of the structural Elements of Plants, London, 1895.
- 22° DEGTIAREFF : Gesichtspunkte zum kritischen Studium der neueren Arbeiten auf dem Gebiete der Ernährung. (cité par Zuntz). *Landwirtsch. Jahrb.*, 1879, 8, p. 55.
- 23° DEHERAIN (P. P.) : Sur la fabrication du fumier de ferme. *C. R. Ac. Sc.*, 1884, 98, p. 377.
- 24° DISTASO (A.) : Sur un microbe qui désagrège la cellulose (*Bacillus cellulosa* desagregans). *C. R. Soc. Biol.*, 1911, 70, p. 395.
- 25° ELLENBERGER (W.) : Zur Frage der Zelluloseverdauung, *Zeitschrift f. Physiol. Chem.*, 1915, 1916, Bd. 96, p. 237.
- 26° ELLENBERGER (W.) et HOFMEISTER (V.) : Ueber die Verdauungssäfte und die Verdauung des Pferdes. *Landwirt. Jahrbücher*, 1887, Bd. 16, p. 276.
- 27° ERIKSON : Die Pilzkrankheiten der landwirtschaftlichen Kultur-gewächse. *Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart*, 1926.
- 28° ERNEST : Untersuchungen über Cellulose aus Zuckerrüben und solche aus Ramie. *Ber. deutsch. chem. Gesellsch.*, 1906, Bd. 39, p. 1947-1951.
- 29° FISCHER : Voir : Smith (106).
- 30° FLEISCHER : Voir : Kuhn (64).
- 31° FLESHIG : Voir : Weiske (115).
- 32° FOUSEK : *Mitteilungen der Hochschule für Bodenkultur. Wien*, I, 1912, p. 217.
- 33° FRÖHLICH : *Jahrbuch f. wissensch. Botanik*, 1908, Bd. 45, p. 256.
- 34° GAYON : Recherches sur la fermentation du fumier. *C. R. Ac. Sc.*, 1884, 98, p. 528.
- 35° GIERISCH : Voir : Waentig (112).
- 36° GIRARD : Voir : Muntz (80).
- 37° GRANDEAU et ALEKAN : Expériences sur l'alimentation du cheval de trait. *Ann. Sc. Agronom.*, 1905, 2, p. 138.

- 38° GRAZIA de CAPRARIS : Voir : Rossi (88).
- 39° GRIMMER : Voir : Scheunert (95).
- 40° GRÖNEWEGE (J.) : Untersuchungen über die Zersetzung der Zellulose durch aerobe Bakterien. *Bull. du jardin botanique de Buitzen zorg*. Série IV, t. 2, fasc. 3, 1920, p. 261-314.
— Weitere Untersuchungen über den eigentlichen Aeroben sowie über den Denitrifikationsprozess. *Mendedeel proefs Landbouw*, 1923, n° 13.
- 41° HALL (VAN) : Cité par Merker : *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1912, Bd. 31, p. 581.
- 42° HAUBNER : *J. f. Landwirt.*, 1855.
- 43° HAUMANN : *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, vol. 16, p. 379.
- 44° HEINZE : *Zentralbl. f. Bakt.* II, 1903, Bd. 10, p. 601.
- 45° HELLER (Fr.) : Untersuchungen über Zelluloseabbau durch Pilze. *Dissert.* Rostock, 1917.
- 46° HENNEBERG et STOHMANN (J.) : Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. *J. f. Landwirt.* 1859, p. 361 ; 1860, Heft I, 1864, Heft 2.
- 47° HOFMEISTER (W.) : Ueber Zelluloseverdauung. *Archiv f. wissen. u. prakt. Tierk.*, 1881, 7, p. 169.
— Ueber Zelluloseverdauung beim Pferde. *Archiv f. wissen. u. prakt. Tierk.*, 1885, II, p. 46.
— Fütterungsversuche mit Schafen. *Landwirt. Versuchsstat.* 1864, 6, p. 185, 301, 397.
- 48° HOFMEISTER (V.) : Voir : Ellenberger (26).
- 49° HOLDEFLEISS et SCHÖNFELDER : *Mitteilungen des Landwirt. Inst. Breslau*. 3, 1900, p. 49.
- 50° HOLDEFLEISS : Die Bedeutung des verdauten Anteils der Rohfaser für die tierische Ernährung. *Zentralbl. f. agr. Chem.*, 1896, 25, p. 372.
- 51° HOPFE (Anna) : Bakteriologische Untersuchungen über die Zelluloseverdauung. *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.*, I, 1919, 83, p. 376.
- 52° HOPPE-SEYLER (F.) : Gährung der Cellulose. *Ber. der deutsch. chem. Gesellsch.*, Bd. 16, 1883, I, S. 122.
— Ueber Gährung der Zellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1886, 10, p. 401.
- 53° HÖSSLIN et LESSER : Ueber die Zersetzung der Zellulose durch den Inhalt des Coecums des Pferdes. *Zeitschr. f. Biol.*, 1910, 54, p. 47.
- 54° ITERSON (C. VAN) : Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen, Verslag der koniglijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Deel XI, 1903, p. 807. Cité et traduit dans *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1904, Bd. II, p. 689.

- 55° KELLERMANN (K.), MAC BETH (I. G.), SCALES et SMITH : Identification and classification of cellulose-dissolving Bacteria. *Zentralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1913-1914, 39, p. 502.
- 56° KELLNER (O.) et KOHLER (A.) : Untersuchungen über Stoff- und Energieumsatz des erwachsenen Rindes bei Erhaltungs- und Produktionsfutter. *Landwirt. Versuchs-Station*, 1900, 53, p. 1.
- 57° KHOUVINE-DELAUNAY (Y.) : Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme (*Bacillus cellulosae* dissolvens). *Thèse Doct. Sc.* Paris. 1923.
- 58° KNAUTHE : Ueber die Verdauung und den Stoffwechsel bei Fischen. *Zeitschr. f. Fischerei*, 1897, 5^e année.
- 59° KNAUTHE et ZUNTZ : Ueber die Verdauung und den Stoffwechsel der Fische. *Archiv f. Anat. u. Physiol.*, Physiolog. Abteilung, 1898, p. 149.
- 60° KNIRIEM (W. von) : Ueber die eiweissparende Wirkung der Zellulose bei Ernährung der Herbivoren. *Zeitschr. f. Biol.*, 1888, 24, p. 293.
- 61° — Ueber die Verwerthung der Zellulose im thierischen Organismus. *Zeitschr. f. Biol.*, 1885, 21, p. 67.
- 62° KÆNIG : Der Kohlenstoffgehalt von Zellulose verschiedener Herkunft. *Berichte der deutsch. Chem. Gesellsch.*, 1906, Bd. 39 p. 3564-3570.
- 63° KUHN, ARONSTEIN et SCHULZE : Berichte über die auf der landwirtschaftlichen Versuchsstation Weende ausgeführten Versuche. *J. f. Landwirt.* 1866, 14^e année.
- 64° KUHN et FLEISCHER : Versuche über die Ausnutzung des blühenden Rothklee's als Grünfutter und als Heu, ausgeführt an der landwirtsch. Versuchsstation, 1869, II, p. 177.
- 65° LAURENT : Recherches expérimentales sur les maladies des plantes, *Annales Inst. Pasteur*, 1898.
- 66° LESSER : Voir Hösslin (53).
- 67° LOHRISCH (H.) : Der Vorgang der Zellulose und Hemizellulose-verdauung beim Menschen und der Nährwert dieser Substanzen für den menschlichen Organismus. *Zeitschr. f. Exp. Path. u. Ther.*, 1908, 5 p. 478.
- Ueber die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1906, 47, p. 200.
- 68° MAC BETH : Voir Kellermann (55).
- 69° MAC FAYEN (A) et BLAXALL (F. R.) : Thermophilic Bacteria, Tr. of Jenner Inst. prev. med., 1899, p. 162.
- 70° MAC GILLAVRY : Sur la digestion artificielle de la cellulose. *Arch. Néerl.*, 1876, 1^{re} série, II, p. 394.
- 71° MARINCOLA-CATTANEO : Voir : Carbone (19).

- 72° MAYER (A.): *Deutsche Landwirt. Tierzucht*, 10, 1906, p. 44.
- 73° MERKER (E.): Parasitische Bakterien auf Blättern von Elodea
C. f. *Bakt.*, Abt., II, 1912, 31, p. 578.
- 74° MIGULA: System der Bakterien.
- 75° MINKMAN: Voir: Beijerinck (10).
- 76° MITSCHERLICH: Ueber die Zusammensetzung der Wand der
Pflanzenzelle. *Annalen Chem. u. Pharm.*, 1850, 75, p. 305.
(Monatsber. d. Berl. Akad., 1850).
- 77° MOLISCH: Voir Merker (73).
- 78° MORITZ: Voir: Biedermann (14).
- 79° MULLER (E.): Ein Beitrag zur Frage der Zelluloseverdauung
im Darmkanale. *Archiv f. ges. Physiol.*, 1901, 83, p. 619.
- 80° MUNTZ (A.) et GIRARD (Ch.): Recherches sur la valeur ali-
mentaire du foin. *Ann. Inst. Agron.*, 1879-1880, p. 229.
— Recherches sur la valeur alimentaire de l'avoine. *Ann. Inst.
Agron.*, 1882-1883, 8, p. 161, 183.
— Recherches sur la valeur alimentaire de l'orge. *Ann. Inst.
Agron.*, 1883-1884, 9, p. 91.
- 81° MÜTTERLEIN (C.): Studien über die Zersetzung der Zellulose
im Dünger und im Boden. *Dissert.* Leipzig, 1913.
- 82° OMELIANSKY (V.): C. R. *Ac. Sc.*, T. 21, p. 653 T. 125,
1897, p. 970, 1131.
— *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* 21, 1902, Bd. 8, p. 193, 225, 257,
289, 321, 353, 385.
— *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* 21, 1903, Bd. 11, p. 369.
» » » » » 1904, Bd. 12, p. 33,
» » » » » 1905-1906, Bd. 15, p. 678.
- 83° PACAUT et VIGIER: Les glandes salivaires de l'escargot.
Archives d'Anatomie microscopique, 1905-1906, 8 p. 425.
- 84° POPOFF (L.): Ueber die Sumpfgasgärung. *Archiv. f. ges. Phys.*,
1875, 10, p. 113.
- 85° POTTER: Bakterien und ihre Beziehungen zur Pflanzen Patho-
logie. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* II, Bd. 28, 1910.
- 86° PRILLIEUX: Corrosion de grains de blé colorés en rose par des
bactéries. C. R. *Ac. Sc.*, 1868.
- 87° PRINGSHEIM (H.): Ueber den fermentativen Abbau der Zelu-
lose. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1912, Bd. 78, S. 266.
— Ueber die Vergärung der Zellulose durch thermophile
Bakterien. Ref. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* II, Bd. 14, 1913,
38, p. 513.
- 88° ROSSI, GRAZIA DE CAPRARIS: Zelluloselösung durch aerobe Bak-
terien, Ref. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* II, Bd. 14, 1905,
p. 529. — *Centralbl. f. Bakt. u. Par.* II, Bd. 15, 1905,
p. 212.

- 89° RÜBNER (M.) : Untersuchungen über die Resorbierbarkeit des Birkenholzes. *Archiv. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.*, 1915, p. 83.
- Weitere Untersuchungen zur Verdaulichkeit des mit Säuren aufgeschlossenen Holzmehles. *Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1917, p. 20.
- Die Verwertung aufgeschlossenen Strohes für die Ernährung des Menschen. *Archiv. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1917, p. 74.
- Die Verdaulichkeit der Vegetabilien. *Archiv. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1918, p. 53.
- Die Verdaulichkeit reiner Cellulose beim Hunde. *Archiv. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1916, p. 159.
- 90° SCALES : Voir Kellermann (55).
- 91° SCHAFFNIT (E.) : Der Schneeschimmel und die übrigen durch *Fusarium nivale* hervorgerufenen Krankheiten des Getreides, *Abt. f. Pflanzenkrankheiten d. Landwirtsch. Inst. Bromberg, Landwirt. Jahrb.*, Bd. 43, 1912.
- 92° SCHELLENBERG (H.) : Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemicellulose. *Flora* 1908, Bd. 98, p. 258.
- 93° SCHEUNERT (A.) : Ueber die Celluloseverdauung bei den Haustieren. III. Mitteilung, Berlin, *Tierärztliche Woch.*, 1910, N° 5, p. 113.
- 94° — Beiträge zur Kenntnis der Zelluloseverdauung im Blinddarm und des Enzymgehaltes des Cäckalsekretes. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1906, 48, p. 9.
- 95° SCHEUNERT (A.) u. GRIMMER (W.) : Zur Kenntnis der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. *Zeitschr. f. Phys. Chem.* 1906, 48, p. 27.
- 96° SCHIKORRA (G.) : *Fusarium*-Krankheiten der Leguminosen. *Arb. aus der Biol. Abt. f. Land- und Forstwirtschaft*, 1906, Bd. V, Heft 4, p. 157.
- 97° SCHLÜESSING (Th.) père : Sur la fermentation forménique du fumier. *C. R. Ac. Sc.*, 1889, 109, p. 835.
- 98° SCHMULIEVITCH : Voir Biedermann (14).
- 99° SCHÖNFELDER : Voir Holdefleiss (49).
- 100° SCHNEIDER-ORELLIS (Otto) : Die Uebertragung und Keimung des Ambrosiapilzes, von *Xyleborus disp.* *Naturw. Zeit. f. Land- und Forstwirtschaft*, Bd. 9, 1911.
- 101° SCHULZE (H.) : Voir Kuhn (63).
- 102° SCHULZE (B.) : Voir Weiske (115).
- 103° SEILLIÈRE (G.) : Sur un cas d'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton, après dissolution dans la liqueur de Schweitzer. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, 61, p. 205.
- Sur la digestion de la cellulose. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, 68, p. 107.

- 104° SENUS (A. C. H. van) : Bijdrage tot de Kennis der Cellulose-
gisting. Leyden, 1890.
- 105° SMITH : Voir Kellermann (55).
- 106° SMITH (E. F.) : Bacillus tracheiphilus, die Ursache des Verwel-
kens verschiedener Cucurbitaceen. *Centralbl. f. Bakt. u.*
Par., II, Bd. I, 1895.
- 107° SMITH (E. F.) : Entgegnung auf Alfred Fischers Antwort in
betreff der Existenz von durch Bakterien verursachten
Pflanzenkrankheiten. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, Bd. 7, 1901.
— Are there bacterial diseases of plants, *Centralbl. f. Bakt.*
u. Par., I, Bd. 8, 1900.
- 108° STOHMANN (J.) : Voir Henneberg (46).
- 109° TAPPEINER (H.) : Ueber Cellulosegährung. *Ber. d. deut. chem.*
Gesell., 1882, (I), 15, p. 999, 1883, (2), 16, p. 1734.
— Ueber die Gährung der Cellulose, insbesondere über deren
Lösung im Darmkanal. *Zeitschr. f. Biol.*, 1884, 20, p. 52.
— Nachträge zu den Untersuchungen über die Gährung der
Cellulose. *Zeitschr. f. Biol.*, 1888, 24, p. 105.
- 110° TOLLENS : *J. f. Landwirt*, Bd. 44, 1896, p. 171.
- 111° VIGIER : Voir Pacaut (83).
- 112° WÄNTIG et GIERISCH (W.) : Ueber ein einfaches Verfahren,
die Verdaulichkeit des Celluloseanteils von Pflanzenfasern,
insbesondere von Holzfasern, schätzungsweise zu bestimmen.
Zeitschr. f. Phys. Chem., 1918, 103, p. 87.
- 113° WAKKER : Vorläufige Mitteilungen über Hyazinthenkrank-
heiten. *Bot. Centralbl.*, Bd. 14, 1883.
- 114° WEISKE (H.) : Ueber die Verdaulichkeit der Cellulose beim
Schwein. *Landwirt. Versuchs-Stat.*, 1872, 15, S. 90.
- 115° WEISKE (H.), SCHULZE et FLESHIG : Kommt der Cellulose
eiweissparende Wirkung bei der Ernährung der Herbivoren
zu ? *Centralbl. f. Biol.*, 1888, 24, p. 353.
- 116° WEISKE : Untersuchungen über die Verdaulichkeit der Cellulose
beim Menschen. *Zeitschr. f. Biol.*, 1870, 6, p. 456.
- 117° WICKE (H.) : Die Dekortikation des Getreides und ihre hy-
gienische Bedeutung. *Archiv f. Hyg.*, 1890, II, p. 335.
- 118° WILSING : Ueber die Mengen der vom Wiederkäuer in den
Entleerungen ausgeschiedenen flüchtigen Säuren. *Zeitschr.*
f. Biol., 1895, 21, p. 625.
- 119° ZUNTZ : Voir Knauthe (59).

II^e PARTIE

- 1° ABDERHALDEN u. PRINGSHEIM : *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*,
1910, Bd. 65, p. 180.

- 2° ALBACH (W.): *Zeitschr. f. wissen. Mikroskopie*, 1927, 44, p. 333—334.
- 3° APPEL u. WOLLENWEBER: *Grundlage einer Monographie der Gattung Fusarium. Arbeiten aus der Biologischen Abt. f. Land- und Forstwirtschaft*, Bd. VIII, Heft 1, Berlin, 1910, S. 5.
- 4° — Idem. S. 102.
- 5° BACH (D.): Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Thèse Doctor. Sc.*, Paris, 1925, p. 47 et suivantes.
- 6° — Idem., p. 170 et suivantes.
- 7° BAINIER: Zygosporées de Mucorinées. *Annales des Sciences Nat. Bot.*, 6^e série, 183, t. XV, p. 314, Paris.
- 8° — Idem., t. XIX, p. 203—205, Paris, 1883.
- 9° BERTRAND et HOLDERER: *C. R. Ac. Sc.*, 149, 1385, 1909, et 150, 230, 1910.
- 10° — *Bull. de la Soc. Chim. de France*, série 4, t. 7, 1910, p. 177.
- 11° BIDWELL (G. L.): Report on crude fiber. *J. Assoc. of Agric. Chem.*, 1921—1922, 5, p. 421.
- 12° BLAKESLEE: Conjugation in the heterogamic genus *Zygorhynchus*. *Mycol. Centralbl.*, Bd. 2, p. 241, 1913.
— Idem. *Annales Mycol.*, vol. IV, n° 1, 1906.
- 13° BOURQUELOT: La tréhalase. *Bull. Soc. Mycol. de France*, 9, 189 à 194, p. 180, 1893.
Transformations du tréhalose en glucose par un ferment soluble: la tréhalase.
- 14° BUCHNER (E.) et MEISENHEIMER (J.): Enzyme bei Spaltpilzgährungen. *Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft.*, T. XXXVI, p. 206, 1903.
- 15° CARPIAUX (E.): Voir Grégoire (25).
- 16° CLARK et LUBS: Determination of hydrogen ions. *Williams and Wilking Co*, Baltimore, U. S. A., 1920.
— *Journal Ind. Engin. Chim.*, 12, p. 293, 1920.
- 17° DESCOURAUX (J. M. C. M.): Contribution à l'étude de nouveaux milieux de culture pour les dermatophytes. *Thèse Doctor. Pharm. Strasbourg*, 1926, p. 29.
- 18° DMOSCHOWSKI et TOLLENS (B.): Ueber eine Methode der quantitativen Cellulosebestimmung. *Journ. Landwirt.*, 1910, 58, p. 1.
- 19° FISCHER et ZEMPLEN: *Liebig's Annalen*, 372, 254, 1910.
— *Annalen der Chemie*, Bd. 365, p. 1, 1909.
- 20° FORBES (E. B.) et MENSCHING (S. E.): An improved method of Croude fiber estimation. *J. Ind. Eng. Chem.*, 1913, 5, p. 258.
- 21° FUHRMANN: *H. d. Bioch. Arbeitsmeth. III*, Bd. 3, p. 1209.
- 22° GAYON: Fermentations par les Mucorinées. *Annales de Chimie et de Physique*, V^e série, t. XIV, 1878, p. 286.

- 23° GAYON et DUBOURG : *Annales de l'Inst. Pasteur*, I, p. 534, 1887.
- 24° GRANDEAU (L.) : *Analyse des matières agricoles*, 1897, 2, p. 213.
- 25° GRÉGOIRE (Ach.) et CARPIAUX (Em.) : Appareil pour le dosage de la cellulose. *Bull. Soc. Chim. belge*, 1910, 24, p. 217.
- 26° GRÆDEL et SCHNEIDER : Biologische Wirkung der Röntgenstrahlen auf einzellige Lebewesen nach Untersuchungen mit Paramäcien. *Strahlentherapie*, Bd. XXII, Heft I, p. 92—106.
— *Strahlentherapie*, Bd. XXIII, Heft 3, S. 411.
- 27° HANSEN (E. Ch.) : *Saccharomyces coloré en rouge*. *C. R. des travaux du Lab. de Carlsberg*, t. XXIV, 1879.
— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. *C. R. des travaux du Lab. de Carlsberg*, 1891, T. 3, I. — T. V, liv. 3, 1902.
- 28° HELLER (Fr.) : Untersuchungen über Celluloseabbau durch Pilze. *Dissert. Rostock*, 1917, p. 46.
- 29° HELLRIEGEL et LUKANUS : Ueber den Nährwert des Brühhäcksels. *Landwirt. Versuchs-Stat.*, 1865, 7, p. 242.
- 30° HOFMEISTER (W.) : Die Rohfaser und einige Formen der Zellulose. *Landwirt. Jahrb.*, 1888, 17, p. 329 et 1899, 18, S. 767.
- 31° HOLDEFLEISS : Eine abgekürzte Methode der Rohfaserbestimmung. *Landwirts Jahrb.*, Suppl. I, 1877, p. 103.
- 32° Holderer : Voir Bertrand (9 et 10).
- 33° HOLM et POULSEN : Voir GUILLERMOND : Les levures, Paris, Doin, p. 220.
- 34° ITERSON (Van) : Verslagen der König. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, 1903, Deel XI, p. 807.
— Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1904, II, p. 689.
- 35° KALNING (H.) : Eine beschleunigte Rohfaserbestimmung. *Zeit. ges. Getreidewesen*, 1913, 5, p. 6.
- 36° KHOUVINE-DELAUNAY (Y.) : Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme (*Bacillus cellulosæ dissolvens*). *Annales de l'Inst. Pasteur*, t. XXXVII, 1923, n° 8, p. 719.
- 37° KLÖCKER (A.) : Une espèce nouvelle de la famille *Saccharomyces* (*Mucédinées Saccharomyces Saturnus*). *C. R. des travaux du Lab. de Carlsberg*, t. VI, liv. 2, 1903.
- 38° KNIRIEM (W. von) : Ueber die Verwertung der Zellulose im tierischen Organismus. *Zeit. f. Biol.*, 1885, 21, p. 67.
- 39° KÖNIG (J.) : Bestimmung der Cellulose, des Lignins und Kutins in der Rohfaser. *Zeit. f. Unters. Nahr. u. Genuss.*, 1906, (2), 12, p. 385.
- 40° KÖNIG (X.) : Voir Skraup (66).
- 41° KUHN : Voir Première partie (63, 64).

- 42° LINDNER (P.) : Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Paul Parey, Berlin, 6^e édition, 1909.
- 43° LOHRISCH : Voir Simon (65).
- 44° LUBS : Voir Clark (16).
- 45° LUKANUS : Voir Hellriegel (29).
- 46° MAQUENNE et GOODWIN : Recherches sur le cellulose. *Bull. Chim. Soc.*, Paris, t. 31, 3^e série, 1904, n° 160, p. 854.
- 47° MATRUCHOT : Recherches sur le développement de quelques Mucédinées. *Thèse Doct. Sc.*, Paris, 1892.
- 48° MEISENHEIMER : Voir Buchner (14).
- 49° MENSCHING : Voir Forbes (20).
- 50° MOLLIARD (M.) : Production d'acide citrique par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 168, 1919, p. 360.
— Influence de la réaction du milieu sur la respiration du *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Soc. Biol.*, 83, 1920, p. 50.
— Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 174, p. 881.
— Influence de la nature des sucres sur la formation d'acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* sur milieux déséquilibrés. *C. R. Soc. Biol.*, 90, p. 1395.
- 51° MONTANÉ : Voir Terroine (69).
- 52° MUNTZ : Voir Schloëssing (62).
- 53° NADSON et PHILIPOW : Influence des rayons X sur la sexualité et la formation de mutantes chez les champignons inférieurs (Mucorinées). *C. R. Soc. Biol.*, t. XCIII, p. 473.
- 54° OMELIANSKY : *Lafars Handbuch der technischen Mycologie* Jena, 1904—1906, Bd. 3, p. 245.
— Zur Frage der Zellulosegährung. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1913, 36, S. 472.
- 55° OPPENHEIMER (C.) : Die Fermente und ihre Wirkung, Leipzig, 1910, Spezieller Teil, VI Kap., p. 110.
- 56° PASTEUR : Tartrate d'ammonium et *Penicillium glaucum*. Voir Lambling, *Précis de Biochimie*, Paris, Masson, 1919, p. 110.
- 57° PHILIPOW : Voir Nadson (53).
- 58° PORTIER (P.) : Recherches physiologiques sur les champignons entomophytes. *Thèse Doctorat Sc.*, Paris 1911, p. 11.
- 59° PRINGSHEIM : Ueber fermentativen Abbau der Zellulose. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1912, 78, p. 266.
— Ueber die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien. *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 1913, 38, p. 513
— Die Beziehungen der Zelluloseversetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur. *Mitt. deut. Landwirt. ges.*, 1913, 28, p. 26, etc.

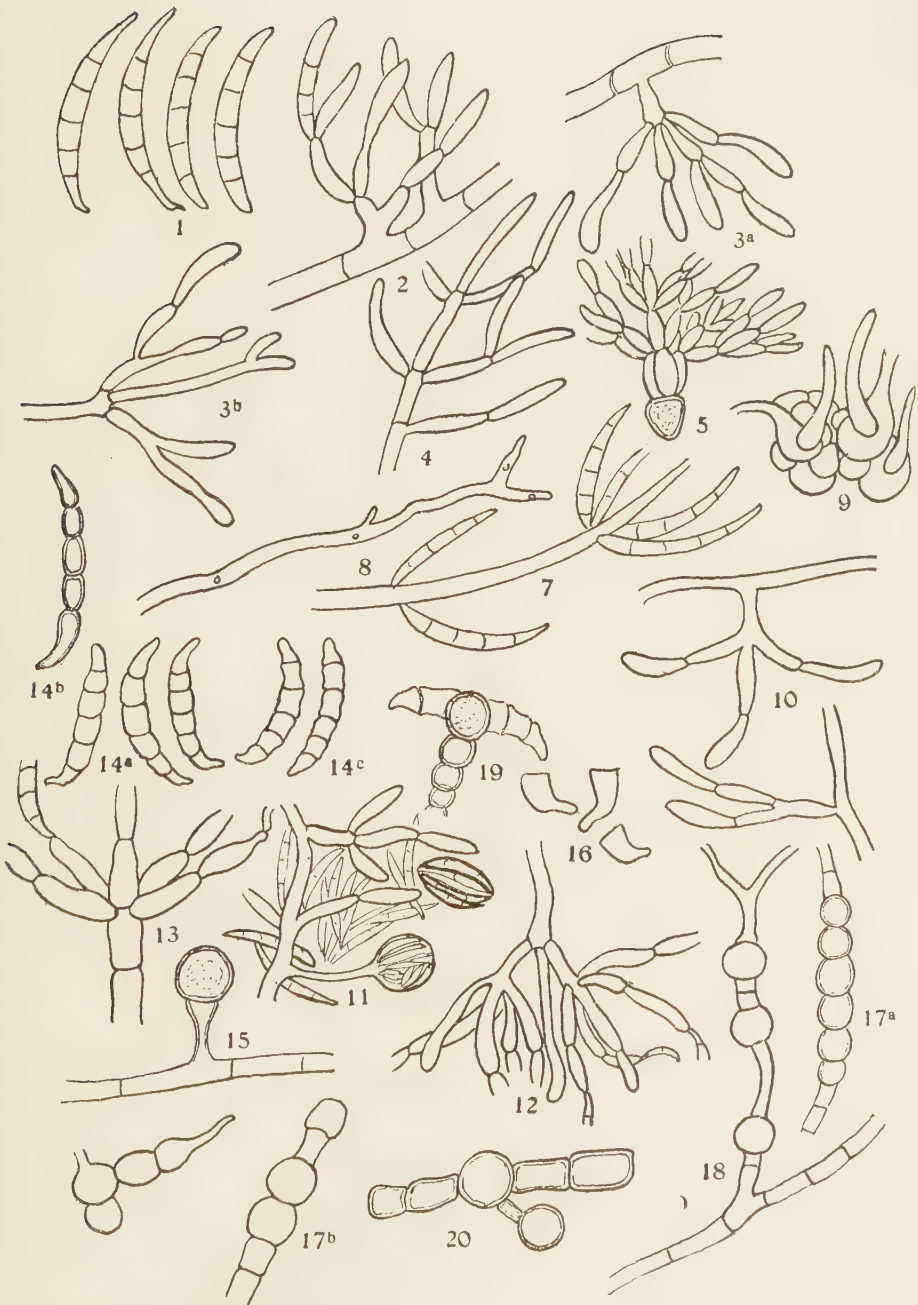
- 60° PURIEVITSCH (K.) : Untersuchungen über die Eiweissynthese bei niederen Pflanzen. *Bioch. Zeitschr.*, 1912, 38, p. 1.
- 61° RABENHORST (L.) : Kryptogamen-Flora, Phycomycètes, IV^e Abt. Leipzig, 1892, p. 178 et suivantes.
- 62° SCHLÖESSING (Th.) et MUNTZ (A.) : Recherches sur la nitrification par les ferments organisés. *C. R. Ac. Sc.*, 1878, 86, p. 892.
- 63° SCHNEIDER : Voir Grædel (26).
- 64° SCHULZE (F.) : Beitrag zur Kenntniss des Lignins. *Chem. Centralbl.*, 1857, p. 321.
- 65° SIMON (O.) et LOHRISCH (H.) : Eine neue Methode der quantitativen Zellulosebestimmung in Nahrungsmitteln und Fæces. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1904, 42, p. 55.
- 66° SKRAUP u. KÖNIG : Ueber die Cellobiose. *Sitzungsber. der K. Akad. d. Wissen. Abt.*, II, Bd. CX, 1901, Wien, 110, p. 843.
- 67° SÖRENSEN : *Comptes-Rendus du Lab. Carlsberg*, VII, I, 1907.
- 68° SWEENEY (O.) : Cité par Kennedy, A modification of the Sweeny method for crude fiber. *Jour. Ind. Engl. Chem.*, 1912, 4, p. 600.
— *U. S. Dep. Agr. Bur. Chem. Bul.*, 137, p. 157.
- 69° TERROINE, WÜRMSER et MONTANÉ : Influence de la composition des milieux nutritifs sur la composition de l'*Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Biol.*, 1922, 4, p. 623.
- 70° TIEGHEM (Van) : *Ann. Sc. Nat.*, 6^e série, IV, p. 390 1876.
- 71° TOLLENS : Voir Dmochowsky (18).
- 72° VUILLEMIN : Etudes biologiques sur les champignons. *Bull. Soc. Sc. Nancy*, 2^e série, t. 8, 1886, p. 90.
- 73° — *Bull. Soc. Sc. Nancy*, 2^e série, t. VII, Fasc. XX, 1886-1887, p. 97.
- 74° WATTENBERG : Eine vereinfachte Methode der Weender Rohfaserbestimmung. *J. f. Landwirt.*, 1880, p. 273.
- 75° WEENDE : Voir Henneberg (première partie, 46).
- 76° WICKE (H.) : Ueber den Einfluss einer Fettbeigabe auf die Ausnutzung der Nährstoffe im tierischen Organismus. *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, 1895, 21, p. 42.
- 77° WINOGRADSKY : *Centralbl. f. Bakt. u. Par.*, II, 5, 1899, p. 334.
- 78° WOLLENWEBER : Voir Appel (3).
- 79° WÜRMSER : Voir Terroine (69).
- 80° ZEMPLÉN : Voir Fischer (19).
- 81° ZOPF : *Verhand. Bot. Ver. Prov. Brandenburg*, XXIII, p. 22, 1881.

Planche I



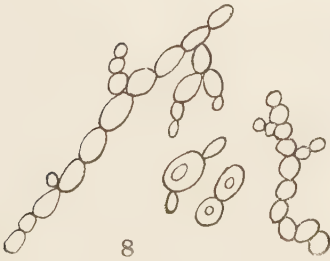
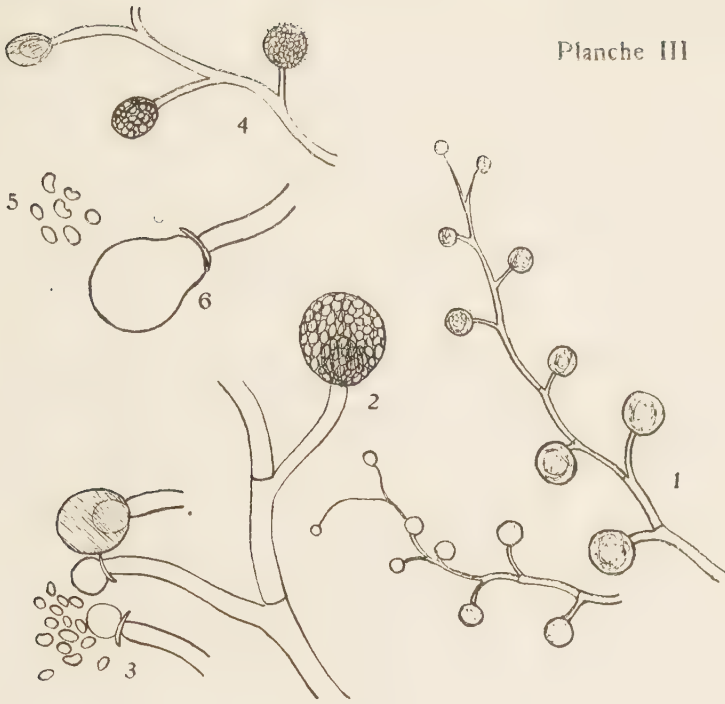
Fig. 3. *Mucor spinosus* Van Tieghem. 1. Jeune sporangie incolore. 2. Sporangie mûr. 3. Sporangie. 4. Différents aspects des columelles. 5. Spores avec cristaux provenant des membranes des sporanges. 6. Spores germant sur milieu liquide. 7. Spores germant sur milieux liquides acides. 8. Formes toruleuses prélevées dans la profondeur du milieu liquide. 9. Formes cellulophages, germant en milieu liquide alcoolique (formes levures). 10. Spores germant en goutte pendante donnant un filament sporangifère et montrant la ramification du *Mucor spinosus*.

Planche II



1 à 9 *Fusarium metachroum* — 10 à 20 *Fusarium rubiginosum*

Planche III



1, 2, 3 *Mucor alternans*, 4, 5, 6 *Mucor piriformis*,
7, 8, 9, 10 *Willia saturnus*, var. *cerambycida*.

TABLE DES FIGURES

- Fig. 1 — Chambre à dissection.
 » 2 — Appareil pour la séparation des germes par filtration.
 » 3 — Appareil pour la séparation des germes par filtration
 (Fuhrmann modifié).
 » 4 — Boîte de Borrel pour culture en goutte pendante.
 » 5 — Tubes de Roux pour anaérobiose.
 » 6 — *Mucor spinosus* sur milieu minéral cellulosé.
 » 7 — *Mucor spinosus* : influence du radium (formes en crosses).
 » 8a — *Mucor spinosus* : formation des gamètes.
 » 8b — *Mucor spinosus* : formation des gamètes.
 » 9 — *Mucor spinosus* : Zygosporé.
 » 10 — *Mucor spinosus* : aspect de différentes columelles.
 » 11 — *Mucor spinosus* : sporanges, sporangioles et spores.
 » 12 — *Mucor alternans*.
 « 13 — Fibre de cellulose attaquée par le *Bacillus cellulosaë*
cerambycidus n. sp.

Planche I.

Mucor spinosus :

- 1) Jeune sporange incolore.
- 2) Sporange mûr.
- 3) Sporangiole.
- 4) Différents aspects des columelles.
- 5) Spores avec cristaux provenant des membranes des sporanges.
- 6) Spores germant sur milieu solide.
- 7) Spores germant sur milieu liquide acide.
- 8) Formes toruleuses prélevées dans la profondeur du milieu liquide.
- 9) Formes celluiophages.
- 10) Spores germant en milieu liquide alcoolique (formes levures).
- 11) Spores germant en goutte pendante, donnant un filament sporangifère et montrant la ramification du *Mucor spinosus*.

Planche II.

Fusarium metachroum

- 1) Conidies.
- 2) Ramifications aériennes et naissance des conidies.
- 3) Formation des appareils conidiens à deux ou quatre rameaux.
- 4) Insertion des ramifications en étages superposés.
- 5 et 6) Appareils conidiophores isolés d'une culture sur coupe végétale.
- 7) Naissance des conidies directement sur le filament.
- 8) Commencement de germination en milieu maltosé.
- 9) Stroma à l'intérieur d'un tissu végétal.

Fusarium rubiginosum

- 10) Ramifications latérales du mycélium avec formation de stérigmates.
- 11) Agglomération des conidies en mycélium aérien.
- 12 et 13) Insertion des stérigmates en verticilles à 4 branches.
- 14) Conidies.
- 15) Chlamydospores en forme de mycogone.
- 16) Point d'insertion des conidies.
- 17) Chlamydospores en chaînettes.
- 18) Croissance des filaments sur milieu ammoniacal.
- 19) Conidies avec chlamydospores germant sur milieu ammoniacal.
- 20) Conidies sur milieux desséchés.

Planche III.

Mucor alternans :

- 1) Hyphe fructifère montrant les ramifications.
- 2) Sporange.
- 3) Columelles et spores.

Mucor piriformis :

- 4) Hyphe fructifère avec sporanges.
- 5) Conidies.
- 6) Columelle.

Willia Saturnus :

- 7) Formes levures du voile.
- 8) Formes levures immergées.
- 9) Formes asques, ascospores en présence de bactéries.
- 10) Ascospores en état de germination.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction

Première partie : Historique :

CHAPITRE PREMIER

Recherches sur les ferments dégradant la cellulose dans le tube digestif des animaux.....

CHAPITRE II

La dégradation de la cellulose par les microorganismes :

1^o La dégradation bactérienne de la cellulose dans le sol et le fumier

2^o La dégradation de la cellulose par des bactéries chez l'homme et les animaux

3^o La dégradation bactérienne de la cellulose chez les végétaux

4^o La dégradation cryptogamique de la cellulose dans la nature

CHAPITRE III

Généralités sur la cellulose : constitution, réactions, hydrolyse chimique

Deuxième partie : Recherches personnelles :

CHAPITRE PREMIER

Les larves et les insectes xylophages étudiés

Méthodes et technique générale

CHAPITRE II

Les milieux de culture

CHAPITRE III

Microorganismes cellulophages isolés du *Cossus cossus* LINNÉ ..

CHAPITRE IV

Microorganismes cellulophages isolés de <i>Sciapteron tabaniformis</i> , ROTT	
--	--

CHAPITRE V

Microorganismes isolés de <i>Cerambyx scopolii</i> FÜSSL	
--	--

CHAPITRE VI

Les microorganismes isolés de la lumière de l'intestin chez les insectes étudiés existent-ils dans les essences de bois où vivent ces insectes ?	
--	--

CHAPITRE VII

Considérations générales sur la transformation de la cellulose chez certains insectes xylophages	
<i>Conclusions générales</i>	
<i>Notes bibliographiques</i>	
<i>Table des figures</i>	
<i>Table des matières</i>	

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

ZOOLOGIE : LA DIGESTION CHEZ LES ARTHROPODES

GÉOLOGIE : LA VALLÉE DU RHIN

Vu et approuvé :

Paris, le 6 juin 1929

P. le Doyen de la Faculté des Sciences,

L'Assesseur

Emile PICARD.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

Pour le Recteur

L'Inspecteur de l'Académie

CROUZET,

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
